

**Immunmodulation und Dosis-Wirkungsbeziehung des
kardioprotektiven Adenosinanalogs 3-Deazaadenosin
bei der Lipopolysaccharid induzierten
septischen Kardiomyopathie**

INAUGURALDISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von
AXEL GASSEN
aus Koblenz**

Gießen 2012

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
am Zentrum für Innere Medizin
Abteilung Kardiologie / Angiologie
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. Braun-Dullaeus
Gutachter: Prof. Dr. Dr. Braun
Tag der Disputation: 18.01.2013

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Vorwort	7
2 Einleitung	8
2.1 Das septische Krankheitsbild	9
2.2 Kardiomyopathie – septische Kardiomyopathie	10
2.3 Pathomechanismus der septischen Kardiomyopathie	12
2.3.1 Endotoxin als bakterieller Sepsis-Trigger	13
2.3.2 Die Rolle zirkulierender kardiodepressiver Faktoren („primäre Zytokine“)	17
2.3.3 Das Endothel als Syntheseort vasoaktive Substanzen („sekundäre Zytokine“)	18
2.3.4 Globale Hypoperfusion versus Mikrozirkulationsstörung	21
2.3.5 Aktivierte Leukozyten versus Endothelzellaktivierung	24
2.4 Leukozytose und die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle	25
2.5 Nuklear Faktor kappa B als zentraler Mediator der Immunantwort	29
2.6 Transmethylierungsprozessen und Wirkungsweise von c3ado	31
2.7 Neplanocin A als irreversibler Inhibitor der Transmethylierung	35
2.8 Herleitung der Fragestellung, vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe und Ziel dieser Arbeit	35
3 Material und Methoden	37
3.1 Tiere und Tierhaltung	37
3.2 Versuchsplanung und Festlegung der Konditionen	37
3.3 Blutgewinnung und Organentnahme	39
3.3.1 Bestimmung der Blutwerte	40
3.3.2 Verwendete Pharmaka bei der Vorbehandlung und Organentnahme	40
3.4 Modell der Organperfusion	41
3.4.1 Versuchsaufbau und Durchführung der Organperfusion	41
3.4.2 Messung der Myokardfunktion	44
3.4.3 Material für die Organperfusion nach Langendorff	45
3.4.4 Datenerhebung und -verarbeitung der Perfusionswerte	45

3.5	Immunhistochemie	46
3.5.1	Präparation und Aufbewahrung	46
3.5.2	Gefrierschnitte im Kryostat	46
3.5.3	Grundlagen der Immunhistochemie	47
3.5.4	Antigennachweis mittels APAAP-Methode	47
3.5.5	Gegenfärbung mit Hämalaun	49
3.5.6	Spezifität und Kontrolle	50
3.5.7	Antikörperversdünnung	51
3.5.8	Durchführung der APAAP-Methode	52
3.5.9	Auszählverfahren	53
3.5.10	Material und Reagenzien der Immunhistochemie	54
3.6	Statistische Auswertung	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Übersicht	57
4.2	Ergebnisse der Blutwertbestimmung	57
4.3	Ergebnisse der Perfusion	62
4.3.1	Linksventrickulär entwickelter Druck (LVDP)	62
4.3.2	Kontraktilitätsparameter (dP/dt_{max})	66
4.3.3	Koronarer Perfusionsdruck	70
4.4	Ergebnisse der Immunhistochemie	74
4.4.1	Histologische Beurteilung der Adhäsionsmoleküle	74
4.4.1.1	Expression von ICAM-1	74
4.4.1.2	Expression von VCAM-1	77
4.4.2	Marker der myokardialen Leukozytenakkumulation	78
4.4.2.1	Expression von ED1	79
4.4.2.2	Expression von CD11b	80
5	Diskussion	83
5.1	Herleitung der Fragestellung	83
5.2	LPS verursacht kardiale Funktionsstörung – c3ado kardioprotektiv	84
5.3	Dosisabhängige Expressionshemmung von Adhäsionsmolekülen + Inhibition der Leukozytenmigration	86
5.4	Hämoprotektive Wirkung von c3ado auf das Blutbild im Sepsismodell – ein zytotoxischer Eigeneffekt?	88
5.5	Keine Kardioprotektive Wirkung von Neplanocin – Erklärungsansatz für die kardioprotektive Wirkungsweise von c3ado?	91
5.6	Klinische Relevanz der Ergebnisse	92

6	Zusammenfassung	94
7	Summary	96
8	Abkürzungsverzeichnis	98
9	Literaturverzeichnis	100
10	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	114
11	Danksagung	115
12	Tabellarischer Lebenslauf	116

1 Vorwort

Die experimentellen Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Juli 2000 bis Januar 2003 im Laborbereich der Molekularen Kardiologie durchgeführt und betreut von Herrn Prof. Dr. med. R. Braun-Dullaeus am Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik (Leiter Prof. Dr. Tillmann) der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie, die eine schwerwiegende Schädigung und Funktionsbeeinträchtigung des Herzens im Rahmen des septischen Krankheitsbildes hervorruft. In diesem Zusammenhang wurde unter Einflussnahme des sepsisinduzierenden Endotoxin sowohl die Herzfunktionseinschränkung am isolierten, frei perfundierten und prämedizierten Rattenherzen untersucht, als auch die immunhistochemischen Veränderungen beleuchtet. Vorausgegangene wissenschaftliche Studien wiesen auf die kardioprotektive Wirkung des Medikaments 3-Deazaadenosin hin. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine Dosis-Wirkungs-Beziehung durch die Vorbehandlung der Ratten in unterschiedlichen Dosierungen des Medikaments 3-Deazaadenosin (c3ado) erstellt. Da über den Wirkungsmechanismus von 3-Deazaadenosin im multifaktoriellen Sepsisgeschehen bisher nur wenig bekannt ist, sollte daher mit Hilfe eines weiteren Medikaments, Neplanocin, ein möglicher Erklärungsansatz für die Wirkungsweise gefunden werden.

2 Einleitung

Während seines gesamten Lebens ist der menschliche Organismus einer großen Anzahl pathogener Umwelteinflüsse ausgesetzt, denen er mithilfe eines komplizierten Abwehrsystems entgegentritt. Im Laufe der Phylogenese wurden diese komplexen Mechanismen zunehmend verfeinert und bilden im hochdifferenzierten Organismus ein ausgeprägtes und eng miteinander verflochtenes System humoraler und zellulärer Abwehrreaktionen. Entscheidend ist die Fähigkeit auf Umwelteinflüsse zu reagieren und schädigende Prozesse neutralisieren zu können.

Nicht selten aber entstehen im Krankheitsverlauf ernstzunehmende Komplikationen bis hin zu lebensbedrohlichen Situationen, die einer medizinischen Intervention bedürfen. Ein Beispiel ist die Sepsis. Die Früherkennung von Krankheitserregern und das Wissen um die Pathophysiologie sowie der Therapiemöglichkeiten sind daher von entscheidender medizinischer Bedeutung.

Erst vor wenigen Jahren, im Oktober 2002, forderten Intensivmediziner auf dem Jahreskongress der Europäischen Gesellschaft für Intensivmedizin eine gemeinsame Aktion gegen den ältesten Killer der Welt: die Sepsis [1].

Mit einer ins Leben gerufenen „Surviving Sepsis Campaign“ und einer verabschiedeten Deklaration wird international zur dringlichen Senkung der Sepsis-Sterblichkeit aufgerufen, fordert Sepsis doch 1400 Menschenleben weltweit jeden Tag. Dabei erliegt ein Großteil der Patienten innerhalb eines Monats dem Tode. Im klinischen Alltag begegnet man Sepsis nicht nur bei älteren Patienten oder als Komplikation einer im Krankenhaus erworbenen Infektion, vielmehr kann jeder von der Entwicklung einer Sepsis betroffen sein. Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko besteht jedoch vor allem nach Operationen, Entzündungen, Verletzungen, sowie Verbrennungen oder malignen Tumorprozessen [1].

Sepsis stellt eine zunehmend ernstzunehmende klinische Komplikation dar. In Deutschland werden, nach den Daten des Kompetenzwerkes Sepsis (SepNet – Stand: 2005), auf den Intensivstationen jährlich ca. 150.000 Patienten mit einem septischen Krankheitsbild behandelt, davon ca. 75.000 Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock. Die Letalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks ist mit über 50% nach wie vor sehr hoch und das, trotz beachtlichen Fortschritts in der antibiotischen Therapie und unterstützender apparativer Medizintechnik. Damit ist die Letalität über die vergangenen zehn Jahre nahezu unverändert. Es ist vielmehr zu befürchten, dass die Anzahl der Todesfälle zunehmen wird, denn mit der Zunahme an immer invasiveren diagnostischen und therapeutischen Verfahren steigt das Klientel an immer älter werdenden, immunsupprimierten und schwerkranken Patienten, die von

immer resistenteren Bakterienstämmen bedroht werden [3]. So lässt sich umso leichter die dringende Forderung der Intensivmediziner nach einer zukünftigen Verbesserung von Diagnose und Therapie nachvollziehen und unterstreicht die medizinische Relevanz des septischen Krankheitsbildes.

2.1 Das septische Krankheitsbild

Der Begriff Sepsis (gr. Gärung, Fäulnis) versteht sich als eine systemische inflammatorische Immunreaktion des Organismus als Antwort auf ein Eindringen von Krankheitserregern in die Blutbahn. Ausgehend von einer lokalen Läsion oder über eine lymphogene Ausbreitung gelangen die Krankheitserreger in den Blutkreislauf und führen zu den klinischen Krankheitszeichen wie Fieber oder Hypothermie, Tachykardie ($>90/\text{min}$) und Tachypnoe ($>20/\text{min}$) sowie zu einem Anstieg von Entzündungszellen [2]. Der Organismus reagiert auf die pathogenen Keime mit einem komplexen systemischen Reaktionsablauf, bei dem u.a. Blutgefäße, gelöste Bestandteile des Blutplasmas, Blutzellen wie Leuko- und Thrombozyten und freie Gewebszellen involviert werden, und der dem Zweck dient Schädigungen zu begrenzen, zu beseitigen und den entstandenen Schaden zu reparieren. Zahlreiche Botenstoffe, sogenannte Mediatoren, werden dabei im Zuge der Abwehrreaktion freigesetzt und übernehmen in der ablaufenden Reaktionskaskade eine steuernde Funktion. Morphologisch zeichnet sich dieser Ablauf durch eine Gefäßdilatation und Hyperämie der Ateriolen, Venolen und Kapillaren mit einer Steigerung der Permeabilität und einer Exsudation von phasentypischen Entzündungszellen (z.B. neutrophile Granulozyten) aus. Bleibt der Nachweis eines pathogenen Erregers erfolglos, wird dieser klinische Symptomkomplex als „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) bezeichnet. SIRS stellt eine allgemeine entzündliche Abwehrreaktion dar, wie sie z.B. bei Verbrennungen, operativen Eingriffen, kardiogenem Schock oder polytraumatisierten Patienten ausgelöst werden kann [4].

Bei der Sepsis lässt sich ein mikrobieller Erreger nachweisen, der mitsamt seinen Pathogenitätsfaktoren, z.B. Endo- und Exotoxin, für die Entstehung der generalisierten Infektion verantwortlich ist.

Das Sepsis-Geschehen ist ein dynamischer aggravierender Prozess. Bereits im Stadium der „einfachen“ Sepsis beeinträchtigt die systemische Reaktionskaskade die Mikro- und Makrozirkulation im gesamten Organismus und führt im weiteren Verlauf zur Minderperfusion verschiedener Organe. Die daraus entstehenden Gewebsschädigungen können in Funktionsstörungen einzelner oder mehrerer Organe

resultieren (z.B. Herz, Lunge, Niere, Leber). Dieses fortgeschrittene Stadium wird als „schwere“ Sepsis bezeichnet [4,5]. Die ebenfalls durch Mediatoren ausgelöste systemische Gefäßweitstellung (Vasodilatation) führt zusätzlich zur kardiovaskulären Insuffizienz und in weiterer Progredienz zum septischen Schock, der sich in einem anhaltenden Blutdruckabfall, systolisch unter 90 mmHg, trotz ausreichender Flüssigkeitszufuhr, manifestiert [5]. Dauert dieser hypotone Zustand länger als eine Stunde an und lässt sich die Hypotonie durch weitere Flüssigkeitszufuhr und den Einsatz von Vasopressoren nicht korrigieren, spricht man vom therapierefraktären septischen Schock.

Pathophysiologisch stellt das Multiorganversagen und schließlich der Tod die wahrscheinlich gemeinsame Endstrecke einer persistierender Kreislaufinsuffizienz und erheblichen Funktionsstörung des durch Mediatoren getriggerten Immun-, Gerinnungs- und Komplementsystems dar.

2.2 Kardiomyopathie – septische Kardiomyopathie

Nach der WHO/ISFC (1995) werden alle Erkrankungen des Herzmuskels, die mit einer kardialen Funktionsstörung einhergehen, als Kardiomyopathien bezeichnet. Sie bilden eine Krankheitsgruppe, deren Manifestationen im einzelnen sehr unterschiedlicher Pathogenese und -physiologie unterliegen - gemeinsam führen sie jedoch im progredienten Verlauf zur kardialen Dekompensation und schließlich zum Herzversagen.

Die septische Kardiomyopathie stellt eine Form dieser Krankheitsgruppe dar.

Der Begriff der „akuten septischen Kardiomyopathie“ hat sich in den vergangenen Jahren durch die Erkenntnis einer eingeschränkten Pumpleistung des Herzens während des septischen Schockgeschehens etabliert.

Ihre medizinische Relevanz und das Ausmaß der Herzschädigung wurde häufig unterschätzt [6], da sich die kardiale Pumpleistung des septischen Patienten zunächst von der des Gesunden kaum unterschied oder sogar scheinbar gesteigert war und damit zusätzlich im Kontrast zu den übrigen bekannten Schockformen kardiogener, anaphylaktischer oder hypovolämischer Natur stand. Mit der Entwicklung aufwendiger medizinischer Messtechniken und -methoden änderte sich das Verständnis von der Hämodynamik des septischen Schocks [11]. Die Berücksichtigung des systemischen Gefäßwiderstandes, der während der Sepsis charakteristischer Weise vermindert ist, die Nachlast aufgrund systemischer Vasodilatation senkt und folglich entscheidend die

Herzarbeit erleichtert, gab Aufschluß über die scheinbar „normale“ Herzleistung und verdeutlichte nicht selten eine um 50% reduzierte, nachlastbezogene Herzfunktion [6]. Die systemische Gefäßweitstellung bewirkt zusätzlich eine kardiovaskuläre Insuffizienz und äußert sich in hypotensiven Blutdruckverhältnissen [10]. In Anbetracht dessen kalkulierte Müller-Werdan [6], dass zur Sepsiskompensation ein Anstieg des Herzzeitvolumens um das zwei- bis dreifache adäquat wäre, das in der Sepsis allerdings nur selten registriert wird und somit auf die eingeschränkte kardiale Pumpleistung hinweist.

Bereits in den ersten 24 Stunden einer Sepsisentwicklung kann mittels bildgebenden Herzuntersuchungen, wie Radionuklidventrikulographie und Echokardiographie, eine verminderte Auswurffraktion des linken Herzens (LVEF) nachgewiesen werden, verbunden mit einem Anstieg des enddiastolischen und endsystolischen Volumens [9]. Ohne die entsprechende linksventrikuläre endsystolische Drucksteigerung dilatiert folglich der linke Ventrikel, was aus der Zunahme der Compliance resultiert. Die Compliance (k) ist ein Maß für die Dehnbarkeit eines Systems. Sie errechnet sich aus der Volumenänderung (ΔV) dividiert durch die Druckänderung (Δp) ($k = \Delta V / \Delta p$). Mit dieser Gleichung erklärt sich die Zunahme der Compliance durch die mangelnde Fähigkeit des Herzens auf die Volumenänderung zu reagieren und unterstreicht die myokardiale Depression während der Sepsis [11].

Studien haben gezeigt, dass das Auftreten der linksventrikulären Dilatation mit einer besseren Prognose und geringeren Mortalität assoziiert ist [10]. Man nimmt an, dass die beobachtete Dilatation des linken Ventrikels als kompensatorische Antwort auf die Myokarddepression zu werten ist und damit dem linken Ventrikel ermöglicht, durch Verwendung der *preload reserve* die kardiale Funktion aufrecht zu erhalten [10].

Diagramm 1: Hämodynamisch-kardiale Charakteristika der septischen Kardiomyopathie [2,4,5,6,7,9,10,11,12]

- Systemische Vasodilatation
- Normaler/supranormaler *cardiac output* ($CO = HR \cdot SV$)
- Tachykardie
- Hypotonie
- Reduzierte Nachlast (*afterload* - Kraft gegen die sich der Herzmuskel kontrahiert)
- LVEF-Depression
- Erhöhte Compliance des Ventrikels – linksventrikuläre Dilatation
- Keine globale Ischämie
- Vollständige Reversibilität möglich innerhalb von 7-10 Tagen

Charakteristisch für das Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie ist u.a. die potenziell vollständige Reversibilität. Die Myokarddepression und Ventrikeldilatation erreichen typischerweise nach einigen Tagen ihre komplette Ausprägung und bilden sich nach sieben bis zehn Tage vollständig zurück, sofern eine Infusionstherapie und Katecholaminzufuhr überlebt wird [7,10,12].

2.3 Pathomechanismen der septischen Kardiomyopathie

Trotz neuer Erkenntnisse in der Pathophysiologie der septischen kardialen Dysfunktion, wird die Ursache der septischen Kardiomyopathie noch nicht vollständig verstanden. Zahlreiche Hypothesen zur Erklärung der kardialen Dysfunktion während des septischen Schocks werden in der Literatur beschrieben.

Zunächst nahm man an, dass eine globale myokardiale Hypoperfusion die vorherrschende Ursache der Myokarddepression sei. In den vergangenen Jahren stand die Präsenz von aktivierten Leukozyten und der Effekt von verschiedenartigen zirkulierenden und/oder lokal produzierten Zytokinen bzw. Mediatoren, wie MDS (= *myocardial depressant substances*), im Mittelpunkt des Forschungsinteresses [6, 7,8,9,10,12]. Durch ihre kardiodepressive Wirkung wird diesen proinflammatorischen Mediatoren und Zytokinen eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie zugeschrieben.

Neuere Forschungsergebnisse weisen auf eine mögliche direkte Schädigung des Herzmuskels infolge regionaler Hypoperfusion und mikrovaskulärer Dysfunktion hin, die in Form einer myokardialen lokal begrenzten Ischämie resultiert [6,7,8,9,10,12].

Die Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Pathomechanismen lässt erahnen, dass es sich bei der septischen Kardiomyopathie um ein komplexes Krankheitsbild handelt, für deren Entstehung ein multifaktorieller Krankheitsprozess wahrscheinlich scheint. Einige pathophysiologisch wesentliche Faktoren sollen daher nun erläutert werden.

2.3.1 Endotoxin als bakterieller Sepsis-Trigger

Eine bakterielle Infektion ist die meist verbreitete Ursache des septischen Schocks. Nahezu jedes Bakterium kann eine Bakteriämie verursachen, die potenziell zum septischen Schock mit den Zeichen kardialer Dysfunktion aggravieren kann. In lediglich 30-50% der Fälle lässt sich ein bakterieller Erreger in einer positiven Blutkultur

nachweisen. Ungefähr die Hälfte aller bakteriellen Infektionen lässt sich auf eine Gruppe gram-negativer Bakterien wie E.coli, Salmonella, Shigella, Pseudomonas, Neisseria, Haemophilus zurückführen, deren pathogenetisch bedeutender Sepsis-Trigger ein hochmolekularer Lipopolysaccharid (LPS) - Komplex (= Endotoxin) darstellt [50].

Bakterielles Lipopolysaccharid ist ein wesentlicher Oberflächenbestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und wird während der Zellauflösung freigesetzt. Verantwortlich für die toxische Aktivität der Lipopolysaccharide ist ihr Fettsäurekomponent Lipid A (siehe Abbildung 1). Sowohl die Seitenketten der Polysaccharide (der nichttoxische, aber immungenetische Teil des LPS) und Lipid A bestimmen letztlich die Virulenz des gram-negativen Bakteriums.

Abb. 1: Zellwandstruktur eines gram-negativen Bakteriums

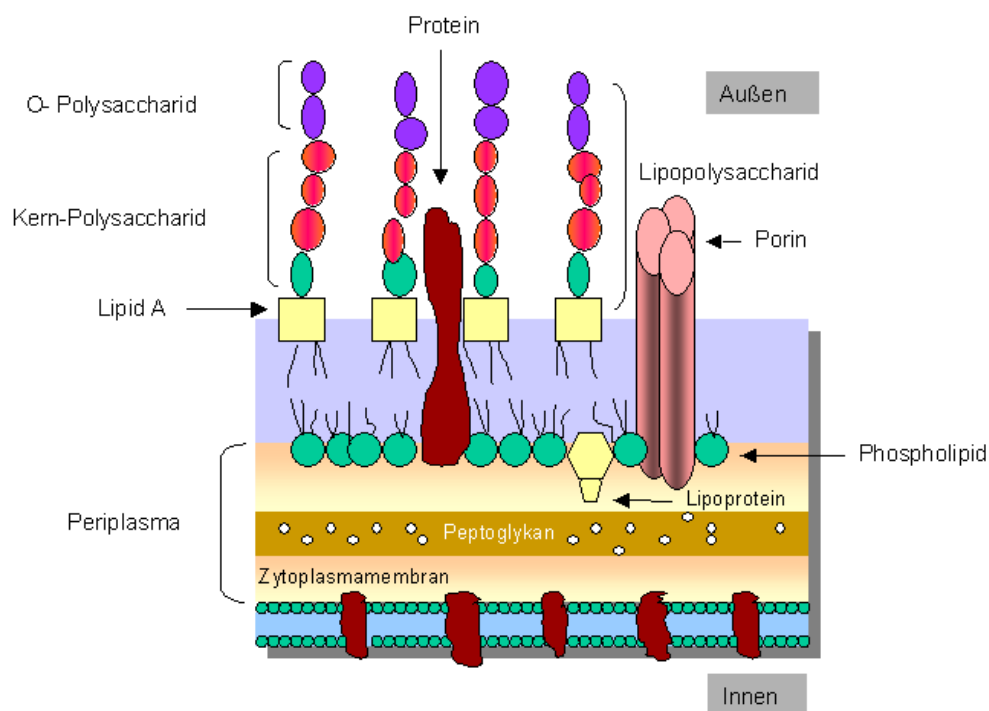


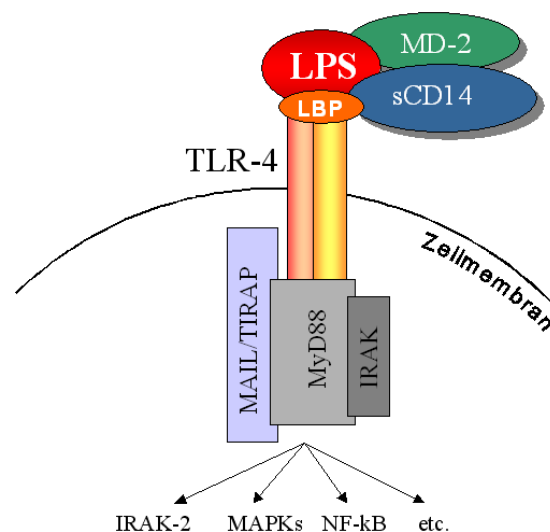
Abb.1 veranschaulicht die schematische Struktur der Zellwand eines gram-negativen Bakteriums mit dem charakteristischen LPS-Anteil (Lipopolysaccharid). Modifiziert nach: Werner Buselmaier: Springer Verlag ,Biologie für Mediziner, 10. Auflage, Seite 381

Eine Endotoxinämie kann sowohl von einer gram-negativen Infektionsquelle ausgehen als auch durch eine Translokation von Bakterien oder Endotoxin in die Blutbahn entstehen, wie es z.B. beim Magen-Darm-Trakt nachweislich bekannt ist. Sind Lipopolysaccharide (LPS) durch Autolyse, Phagozytose, immun- oder antibiotikareaktive Lysis in den Blutkreislauf gelangt, werden sie zunächst an das acute-phase LPS-binding protein (LBP) im Plasma gebunden [123]. LBP scheint essentiell für die rapide Induktion der LPS-vermittelten inflammatorischen Antwort zu sein [124]. Darüber hinaus wird das molekulare Muster (pathogen associated molecular pattern, PAMP) von LPS durch nicht-klonale Rezeptoren der Wirtszellen, u.a. Endothelzellen, erkannt [101,102]. Letztere interagieren spezifisch mit PAMP's und erkennen somit die Anwesenheit von Mikroorganismen bzw. mikrobieller Bestandteile im Organismus. Die Identifizierung solcher molekularen Strukturen erlaubt die Differenzierung des Immunsystems zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“. Dabei übernimmt die Familie der so genannten toll like receptors (TLR) eine essentielle Rolle [101]. Derzeit sind 10 verschiedene transmembrane TLR's (TLR 1-10) bekannt und allesamt konnten im Endothel nachgewiesen werden [103]. LPS interagiert dabei vornehmlich mit TLR-4 in einem Komplex mit dem accessory protein MD-2. Während proinflammatorischer Stimulation ließ sich eine Hochregulation von TLR-4 feststellen, während Hypoxie eine „downregulation“ bewirkte [103].

Ein weiterer Rezeptor mit hoher Affinität zu LPS stellt CD14 dar. Anders als in Gewebszellen besitzen Endothelzellen kein zellständiges CD14, sondern ein Komplex aus löslichem von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttetes sCD14, membranständigem accessory protein (MD-2) und TLR-4 ermöglicht letztlich die LPS-Signaltransduktion über die Zellmembran mittels eines transducers (MyD88) in das Zytosol der Zelle [40,104] (siehe Abb. 2).

Abb. 2: Signaltransduktion von LPS

LPS stimuliert Endothelzellen mithilfe des TLR-4 und führt über die Rekrutierung von Adapterproteinen zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege [40,101,102,103,104,123,124]



Im intrazellulären Zytosol bewirkt die TLR-4-vermittelte Stimulation der Endothelzellen die Rekrutierung von Adapterproteinen an TLR-4, die verschiedene eng miteinander verflochtene Signalwege aktivieren und die inflammatorische Reaktion hervorrufen. Dazu gehört u.a. die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie verschiedener Kinasen wie Tyrosinkinasen oder mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) [101]. Aufgrund seiner postulierten pathophysiologischen Bedeutung bei der Sepsisentstehung wird im folgenden Kapitel 2.5 näher auf die Funktion des Transkriptionsfaktors NF- κ B eingegangen.

Über die Signaltransduktion ist Endotoxin in der Lage die Aktivität und Interaktion einer Reihe von Effektorkaskaden und Akut-Phase-Reaktionen zu induzieren, wie beispielsweise die des Komplement-, Gerinnungs-, Bradykinin/Kinin- und des hämatopoetischen Systems, sowie die Freisetzung einer Vielzahl unterschiedlich agierender Mediatoren (Zytokine) zu triggern [6-12,21-30]. Darüber hinaus wird Endotoxin ein modifizierender Einfluß auf Katecholamine zugeschrieben. Die vasoaktive Sensitivität zu Katecholaminen nach sympathischer Stimulation scheint erheblich reduziert [39] und begünstigt die in der Sepsis auftretenden Mikrozirkulationsstörungen.

Die Konsequenz dieser Reaktionen hängt im Wesentlichen von dem Ausmaß der LPS-Exposition und der Immunkompetenz des Patienten ab. Klinisch ruft die intravenöse Infusion von Endotoxin das typische hämodynamische Profil des septischen Schocks hervor, wie Tachykardie, reduzierter systemischer Gefäßwiderstand, reduzierte linksventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF), erhöhte Compliance und linksventrikuläre Dilatation [9,10,26]. Perfusionsstudien von Ratten- und Meerschweinchen-Herzen konnten mittels LPS-Mengen im Nanogramm-Bereich eine konsekutive Myokarddepression aufzeigen [28,29]. In einer weiteren klinischen Studie konnte bei 43% der Patienten mit septischem Schock Endotoxin im Serum nachgewiesen werden, verbunden mit ausgeprägter kardialer Dysfunktion und einer erhöhten Mortalität [27]. Dabei ließ die Karenzzeit von 3-5 Stunden vermuten, dass es sich nicht um eine direkte Wirkung von Endotoxin selbst, sondern um eine mediator-zytokin-vermittelte (TNF α und IL-1 β) Reaktionskaskade handelt [9,12].

Unterstützt wurde diese Annahme durch die Arbeitsgruppe von Suffredini et al, der es gelang eine erhöhte Serum-Konzentration von TNF α nach Endotoxinexposition nachzuweisen [26].

Neben Endotoxin sind weitere bakterielle pathogene Bestandteile bekannt, die auf ähnliche Weise eine Reaktionskaskade in Gang setzen und in Herzfunktionsstörungen resultieren [30]. Ein Beispiel ist das Exotoxin A des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, das in Studien eine Einschränkung der kontraktile Funktion sowohl an

isolierten Myozyten als auch an isolierten Rattenherzen demonstrierte [10]. Desweiteren sind inflammatorische Reaktionen auf Superantigene (*toxic shock syndrome*) und fungoide Zellwandbestandteile bekannt, auf die aber hier nicht näher eingegangen werden soll.

2.3.2 Die Rolle von zirkulierenden kardiodepressiven Faktoren (primäre Zytokine)

Zu dem hämodynamisch septischen Profil von LPS gehört die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen, die die Freisetzung sogenannter Zytokine triggern. Diese Zytokine stellen eine sehr inhomogene Gruppe unterschiedlicher chemischer Natur und Herkunft dar und unterscheiden sich ebenso in ihrem Angriffspunkt wie auch in ihrer Wirkungsweise. Die Liste der bis dato bekannten endogen inflammatorisch wirkenden Mediatoren mit potenziell kardiodepressivem Einfluß ist extensiv lang [12]. Aus ihr ergibt sich eine Gruppe verschiedener Polypeptide und Protein-Immun-Faktoren, die sich bei septischen Patienten in erhöhtem Maße nachweisen lassen und mit der Substanz MDS (*myocardial depressant substance*) in Zusammenhang gebracht werden. Der Begriff MDS wurde erstmals von „von Wiggers“ im Jahre 1947 erwähnt [6]. Er hielt die Substanz MDS für das Kreislaufversagen im hypovolämischen Schock verantwortlich. Seitdem hat sich in den vergangenen Jahrzehnten die Existenz der MDS etabliert, obgleich deren Isolation und Identifikation der Primärstruktur weiterhin problematisch bleibt [6,12]. Neuere Studien gehen davon aus, dass es sich bei MDS um die Kombination von Interleukin-1beta (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF α) handelt [6,13,91], denen zunehmend eine tragende Rolle bei der Pathogenese vieler infektiöser und inflammatorischer Erkrankungen beigemessen wird [23].

Seit den 80er Jahren, in denen es gelang die Sequenz von TNF α zu bestimmen, das Gen zu decodieren und zu klonen, konnten zahlreiche biologische Eigenschaften dokumentiert werden. So weiß man heute, dass die Synthese von TNF α hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten durch verschiedenartige exogene (z.B. Lipopolysaccharide) und endogene (z.B. IL-1) Substanzen stimuliert wird [14].

Tracey und Co-workers erbrachten den ersten Hinweis, dass infundiertes TNF α in prominenter Myokarddepression resultiert [13,14]. Eine Reihe folgender Studien konnte einen negativ inotropen Effekt von TNF α auf in vitro isolierte Kardiomyozyten nachweisen [15,16,17]. Ebenso die in vitro Inkubation mit humanem septischem Serum

zeigte eine Kontraktilitätsminderung, für die $\text{TNF}\alpha$ verantwortlich gemacht werden konnte [21].

In einer weiteren Studie ließ sich 1-2 Stunden nach Lipopolysaccharid-Gabe an Ratten eine erhöhte zirkulierende $\text{TNF}\alpha$ -Serumkonzentration demonstrieren, während bereits nach 4-6 Stunden die Myokardkontraktilität signifikant reduziert war [22].

Nahezu alle biomolekularen Eigenschaften von $\text{TNF}\alpha$ wurden ebenso an $\text{IL-1}\beta$ beobachtet [18,19]. So konnten erhöhte Konzentrationen an $\text{TNF}\alpha$ und Interleukinen an Patienten mit septischem Schock isoliert werden [10]. Es stellte sich heraus, dass $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ sowohl separat als auch synergistisch kardiodepressiv wirken [12,13,20]. So gelang es u.a. Kumar und Kollegen, an Kulturen von Rattenmyozyten die synergistisch depressive Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf die myokardiale kontraktile Funktion nachzuweisen [21].

Hinsichtlich des Wirkungsmechanismus von $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ auf das Herz findet man in der Literatur verschiedene Theorien. Oral et al. [24] hypothesieren eine sphingosinvermittelte frühe Myokarddepression. Sphingosin wird unmittelbar nach $\text{TNF}\alpha$ -Exposition durch Degranulation von Sphingomyelin gebildet [13], verursacht einen reduzierten Kalziumaustausch durch Rezeptorblockade und resultiert damit in einer negativ inotropen Wirkung [23].

Eine spätere zweite Phase der Zytokinwirkung erfordert Stunden und lässt sich auf eine Stickstoffmonoxid (NO) induzierte Kalzium-Desensibilisierung der Myofilamente zurückführen [23].

Neben der Störung der intrazellulären Kalziumhomöostase wird eine direkte zytotoxische Wirkung, z.B. oxidativer Stress, angenommen. Darüberhinaus werden Zytokine für die Expression von Adhäsionsmolekülen, Freisetzung von prokoagulatorischen Substanzen, Myozyten-Apoptose, Störung der Exzitation-Kontraktion, Desensibilisierung von β -Rezeptoren und die Induktion weiterer, sogenannter sekundärer Zytokine als Effektoren der zytokinvermittelten Myokarddepression verantwortlich gemacht [6,13,18,23,24,25].

2.3.3 Das Endothel als Syntheseort sekundärer Zytokine

Das Endothel gilt als Syntheseort zahlreicher vasoaktiver Substanzen - auch sekundäre Zytokine bezeichnet - die von großer Bedeutung für die kardiovaskulären

Alterationen in der Sepsis sind. Endothelzellen kleiden die Innenseite der Blutgefäße aus und interagieren mit den verschiedensten im Blutfluß zirkulierenden Mediatoren und Pathogenen. Sie nehmen vermittelnden und modulativen Einfluß auf Gerinnungsvorgänge, die Regulierung von Blutdruck, inflammatorische und immunologische Prozesse und besitzen eine Schrankenfunktion gegenüber dem Interstitium [91].

Abb. 3: *Interaktion zwischen Pathogen, Organismus und Endothel*

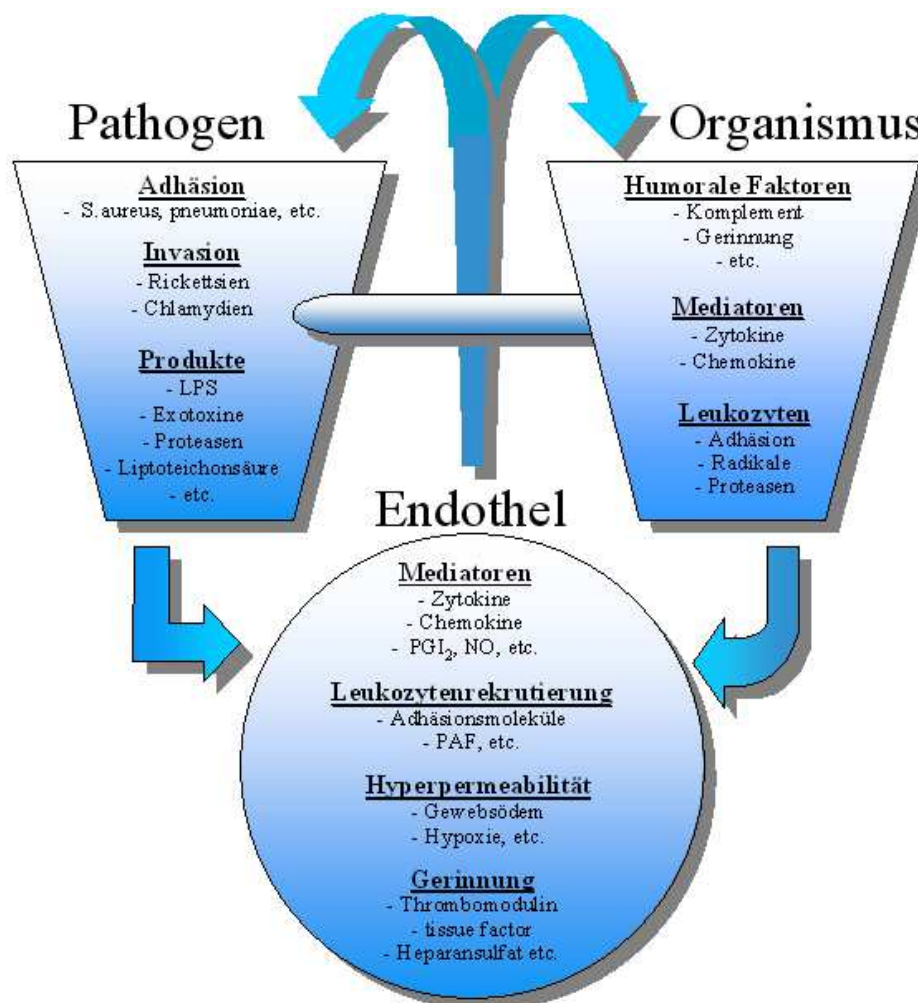


Abb. 3 schematisiert die Interaktion zwischen Pathogen und Organismus, bei der dem Endothel eine zentrale Bedeutung zukommt. Über Adhäsion, Invasion sowie Freisetzung von Pathogenitätsfaktoren wirken pathogene Erreger direkt auf das Endothel, während der Organismus im Zuge der Abwehrreaktion seinerseits über die Freisetzung humoraler Faktoren, Mediatoren und aktivierter Leukozyten zur Stimulation von Endothelzellen führt. Das aktivierte Endothel verliert u.a. die Barrierefunktion und seine gerinnungshemmende Oberfläche. In einem komplexen dynamischen Ablauf wirken die verschiedenen Faktoren aufeinander ein [siehe Text]

Der endotheliale Einfluß auf die Vasomotorik wird unter anderem durch eine Reihe vom Endothel freigesetzter Substanzen mit vasodilatativer (NO, Prostaglandine, Prostazyklin) und vasokonstriktiver (Endothelin, Angiotensin, Thromboxan, Sauerstoffradikale) Wirkung reguliert [72-81].

Über die Synthese pro- und antikoagulatorischer Faktoren (Gewebefaktor, Thrombomodulin, Protein S, Faktor V, Plasminogen-Aktivator + Inhibitor, PAF) übernimmt das Endothel eine regulierende Funktion bei der Homöostase des Gerinnungssystems [54-61].

Im Verlauf eines Entzündungsprozesses ist das Endothel Syntheseort verschiedener inflammatorischer Mediatoren und steuert über die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und VCAM-1, die Migration entzündungskompetenter Zellen (Granulozyten) in den Entzündungsfokus.

Voraussetzung für eine ungestörte Funktion des Endothel- und Blutsystems ist ein Gleichgewicht vasodilatativer und vasokonstriktiver Substanzen, pro- und antikoagulatorischer Komponenten sowie pro- und antiinflammatorischer Mediatoren. Eine Störung dieser empfindlichen Gleichgewichte kann in folgenschweren mikrozirkulatorischen und kardiodepressiven Veränderungen resultieren [88,90,100,107].

Im folgenden Diagramm sollen deshalb einige Substanzen aufgezeigt werden, denen eine pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung der septischen Kardiomyopathie zugeschrieben wird.

Diagramm 2: Kardiodepressive Faktoren [54-61,72-81,88,90,100,107]

1. Vasoaktive Substanzen

a) Plasmatisch:

- Hagemann-Faktor (Gerinnungsfaktor XII) aktiviert:
 - Gerinnungssystem, Fibrin -> Koagulation, Thrombose, DIG
 - Kallikrein-Kinin-System -> Bradykinin -> Hypotension
 - Plasmin -> Fibrinolyse und Hämorrhagie
- Komplementsystem: C3a und C5a -> Histaminfreisetzung -> Vasodilatation + neutrophile Chemotaxis und Akkumulation -> Inflammation

b) Zellulär:

- Vasoaktive Amine (Histamin, Mastzellen, Blutplättchen)
- Serotonin (Blutplättchen)
- $\text{TNF}\alpha$ (Makrophagen und Monozyten)
- PAF, Prostaglandine, Leukotriene, NO, Endothelin, EDHF, $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ (andere Entzündungszellen)

2. Chemotaktische Substanzen

- C5a
- LPS / Endotoxin (bakteriell)
- Formylpeptide (Bakterien, Mitochondrien)
- PAF
- Leukotrien B4
- Fibrinogenspaltprodukte

Die Vielzahl dieser Substanzen und ihrer differenzierten Signaltransduktionswege unterstreichen die klinische Bedeutung der Zytokine bei der multifaktoriellen Sepsispathogenese. Da Anti-Zytokin-Therapien den Krankheitsprozess der septischen Kardiomyopathie bislang nicht verhindern konnten, muß neben den Zytokinen von weiteren Pathomechanismen ausgegangen werden [52].

2.3.4 Globale Hypoperfusion versus Mikrozirkulationsstörung

Während anfangs die Theorie der globalen myokardialen Hypoperfusion [31,32,33] als entscheidender Pathomechanismus für das Entstehen der kardialen Pumpschwäche [31,32] favorisiert wurde, konnten weiterführende Studien diesen Erklärungsansatz nicht bestätigen. Vielmehr demonstrierte Cunnion et al [34] in einer klinischen Studie, dass die Koronardurchblutung bei akut septischen Patienten mit einer Herzfrequenz unter 100, der der Kontrollgruppe entsprach, während Patienten mit einer Herzfrequenz über 100 sogar einen gesteigerten koronaren Blutfluß zeigten. Zudem entwickelte keiner dieser Patienten eine vermehrte Laktatproduktion, die auf einen hypoxisch-ischämischen Zustand hätte hinweisen können.

Neuere Studien haben die Existenz des Energieträgers ATP (Adenosintriphosphat) im Myokard beleuchtet, der bei septischen Patienten keinen quantitativ signifikanten Unterschied zu Kontrollgruppen aufwies [36,37,38]. Somit konnte kein Defekt der myokardialen Energiegeneration, der in einem Zustand substanzieller Ischämie zu erwarten wäre, nachgewiesen werden. Auch Dhainaut et al [35], die in einer größer angelegten Kohortenstudie die Ergebnisse von Cunnion et al bestätigten, schließen eine globale myokardiale Hypoperfusion als Ursache der Myokarddepression aus.

Vielmehr wird heute davon ausgegangen, dass sepsisinduzierte Mikrozirkulationsstörungen für die systemischen Multiorganschädigungen mitverantwortlich sind [39,42]. So beeinträchtigen Mikrozirkulationsstörungen die Funktion und Zirkulation auf der Ebene der kleinsten Blutgefäße (Arteriole, Kapillare und Venole) und stören das sensitive Gefüge aus Sauerstoff- und Nährstofftransport und der Elimination von Schadstoffen [45]. Die gestörte Funktion der Arteriolen wird mit einer verminderten Ansprechbarkeit auf endo- und exogene Stimuli in Zusammenhang gebracht; die der Venolen mit der Aktivierung des Gefäßendothels, die zum einen die Endothelzellen in einen prokoagulativen Zustand mit verstärkter Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion über Adhäsionsmoleküle (wie ICAM-1, VCAM-1) versetzen [39,45] und zum anderen eine erhöhte endotheliale Permeabilität zur Folge hat. Letztere Veränderung resultiert in einem exzessiven transendothelialen Flüssigkeitsaustritt mit konsekutiver interstitieller Ödembildung, die zusätzlich durch die Beteiligung zahlreicher vasoaktiver Substanzen getriggert wird [44]. Der daraus entstehende gesteigerte Gewebsdruck komprimiert das Kapillarnetz und beeinflusst negativ, durch verminderte Sauerstoffextraktion, die nutritive Mikroperfusion kleinster Myokardareale [45].

In diesem Zusammenhang wäre eine relative Hypoperfusion diskreter Herzareale trotz global gesteigerten kardialen Blutflusses denkbar [12]. Pleythysmographische Humanstudien an septisch Kranken wiesen auf eine gestörte mikrovaskuläre Funktion hin. Sie untersuchten den mikrovaskulären Blutfluss während Ruhe und reaktiver Hyperämie. Die Stimulation der reaktiven Hyperämie testet dabei die Fähigkeit eines Organs auf hypoxische Verhältnisse mit forcierter Blutflußsteigerung zu reagieren. Die Untersuchungen demonstrierten eine Beeinträchtigung der kardiovaskulären Autoregulation septisch Kranker im Sinne einer reduzierten metabolischen Sauerstoffkapazität [45,46,47]. Unter metabolischer Sauerstoffkapazität versteht man die Fähigkeit des Herzens durch Steigerung des Blutflusses und Rekrutierung zusätzlicher Kapillaren die Perfusion des Gewebes zu verbessern. Studien an septischen Schafherzen zeigten eine wesentlich eher erschöpfte metabolische

Sauerstoffreserve, als an Normaltieren [41]. Histologische Untersuchungen ischämischer Organe unterstützen die Hypothese der myokardialen Mikrozirkulationsstörung. Hersch et al. [49] fanden am septischen Herzen fokale morphologische Gewebsveränderungen wie Zellnekrosen, degenerative Schäden an Mitochondrien und intrazelluläre Ödeme. Größere zusammenhängende Infarktareale oder Fibrinthromben in den Kapillaren wurden nicht beschrieben, so dass die vorliegenden Beobachtungen mit der Erklärung regionaler Perfusionsstörungen vereinbar sind.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das septische Herz nur unzureichend auf hypoxische Zustände zu reagieren vermag. Dem Verlust an mikrovaskulären Kontrollmechanismen während der Sepsis scheint eine pathophysiologisch tragende Rolle an den resultierenden, lediglich lokal auftretenden, ischämischen Myokardschäden zuzukommen. Mögliche Ursachen lassen sich neben einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen mit Zunahme der Endothelpermeabilität und mikrothrombotischer Gefäßobstruktionen auch auf den bereits oben erwähnten Einsatz „upregulierter“ vasoaktiver Substanzen zurückführen. Das folgende Diagramm gibt eine Übersicht über die postulierten Charakteristika der mikrovaskulären Dysfunktion.

Diagramm 3: Charakteristika der mikrovaskulären Dysfunktion
[39,41,42,44,45,46,47,49]

- Panendotheliale Aktivierung gefolgt von
 - verstärkter Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion
 - gesteigerter Permeabilität
 - reduzierter Kapillarität
 - Beeinträchtigung der arteriellen Vasoregulation (verminderte Ansprechbarkeit auf endo- und exogene Stimuli) beeinflusst negativ
 - Blutfluß
 - Blutvolumen
- ⇒ **Folge:** gestörte nutritive Mikroperfusion kleinster Myokardareale

2.3.5 Aktivierte Leukozyten versus Endothelzellaktivierung

Sowohl die Theorie aktivierter Leukozyten als auch die der Endothelzellaktivierung stehen im Forschungsinteresse und werden als weiterer potenzieller Pathomechanismus der septischen Kardiomyopathie betrachtet. So verbleiben Leukozyten während des Entzündungsprozesses unter dem Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ vermehrt in der Zirkulation der Herzkranzgefäße und retinieren bereits im frühen Stadium im Kapillarbett [8,82,83]. Diese rheologischen Veränderungen werden in einigen Studien für die Myokardschäden und kontraktile Dysfunktion während der Sepsis verantwortlich gemacht. Granton und Kollegen [8] konnten beispielsweise nachweisen, dass das Entfernen von Leukozyten aus dem Blut endotoxin-vorbehandelter Kaninchen bei Reperfusion isolierter aseptischer Kaninchenherzen keinen linksventrikulären Kontraktionsverlust nach sich zog. Sie nahmen an, dass für die Induktion der Myokarddysfunktion sogenannte aktivierte Leukozyten notwendig seien [8]. Neuere Studien unterstützen jedoch die Vermutung, dass neben den aktivierten Leukozyten strukturelle Veränderungen von Endothelzellen eine bedeutende Rolle in der inflammatorischen Reaktionskaskade einnehmen, indem sie die Passage der Leukozyten in den koronaren Mikrogefäßen entscheidend verhindern [82]. Neben intraluminaler Ablagerung von Thrombozyten und Thrombin [83], Endothelzellödem [84], Zytoskelett-Veränderungen [85] und die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren), zählt insbesondere die Stimulation von Adhäsionsmolekülen (wie ICAM-1, VCAM-1) [86,87] zu den markanten endothelialen Veränderungen während des septischen Krankheitsbildes.

Abb. 4: *Pathomechanismen der septischen Kardiomyopathie*

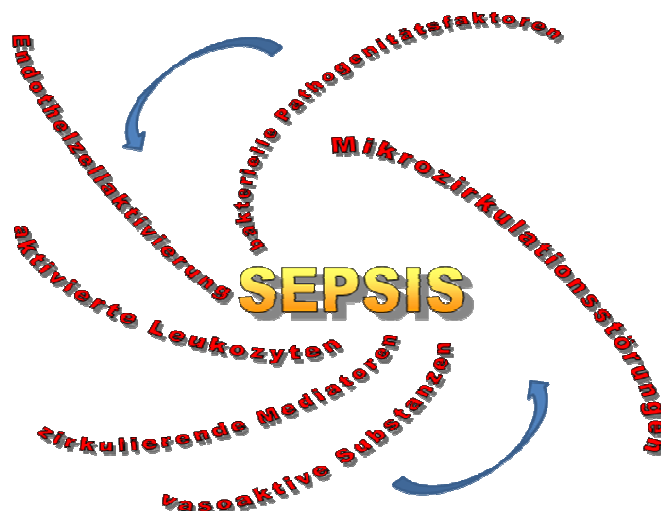


Abb. 4 veranschaulicht die angenommenen z.T. eng miteinander verflochtenen Pathomechanismen der septischen Kardiomyopathie [siehe Text]

2.4 Leukozytose und die Bedeutung von Adhäsionsmolekülen

Während des Sepsisgeschehens entsteht infolge einer bakteriellen Infektion, auf der Ebene der systemisch zellulären Reaktion, eine Leukozytose. Sie beschreibt einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut als Ausdruck einer vermehrten Ausschwemmung aus dem Rückenmark, gesteuert durch die Freisetzung von LRF (Leucocyte Releasing Factor), Komplementfaktor (C3e) und Interleukin 1. Sie stellt eine wichtige Antwort des unspezifischen Immunsystems dar. Treten dabei unreife junge neutrophile Granulozyten mit unvollkommenen abgeschnürten Kernen ins periphere Blut spricht man von einer Linksverschiebung des Blutbildes.

Zudem verkürzt sich die Transitzeit und es kommt zur Stimulation einer verstärkten Neubildung von Granulozyten.

Bereits wenige Minuten nach dem Eintreten der Entzündungsreaktion lassen sich auswandernde Granulozyten nachweisen, die zwischen den Endothelzellen der postkapillären Venolen hindurchtreten und ins infizierte Gewebe wandern. Begünstigt wird dieser Vorgang durch die Konstriktion der Venolen, die zu einem Anstieg des intrakapillären hydrostatischen Druckes führt und neben den Granulozyten auch den Austritt von Flüssigkeit in den extravasalen Raum fördert. Aus der folgenden Eindickung des Blutes und dem erhöhten Strömungswiderstand resultiert eine Verlangsamung der Blutströmungsgeschwindigkeit, womit korpuskuläre Elemente bevorzugt an den Gefäßrand treten und in Kontakt mit Endothelzellen geraten. Unterstützt wird dieser Vorgang durch den Einfluss von inflammatorischen, chemotaktischen Mediatoren, wie $\text{TNF}\alpha$, IL-1+6, Interferon, PAF und LPS, die zur hochregulierten Expressierung von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen, Granulozyten, Mono- und Thrombozyten führen [89,86,108-115]. Neben den rheologischen Veränderungen des Gefäßbettes führt vor allem die systemische Expressierung von Adhäsionsmolekülen im fulminanten Sepsisgeschehen zu Mikrozirkulationsstörungen und morphologischen Gewebeveränderungen.

Je nach ihrer chemischen Struktur werden die Adhäsionsmoleküle in Selektine, Integrine und Moleküle der Immunglobulin-Superfamilie (IGSF) unterteilt [108,116].

Die folgende Darstellung (Diagramm 4) gibt Übersicht über primäre Funktion, Familie und Expressionsort der Adhäsionsmoleküle [108,116].

Diagramm 4:**Einteilung der Adhäsionsmoleküle**

Familie	Expressionsort
Selektine <i>Ca²⁺-abhängige transmembrane Glykoproteine – vermitteln die schwache reversible Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand</i>	
▪ E-Selektin (ELAM-1) endothelial-leukocyte-adhesion-molecule-1	Endothelzellen
▪ P-Selektin (GMP-140) granule-membrane-protein 140	Thrombozyten
▪ L-Selektin	Leukozyten (PMN)
Integrine <i>Leukozytäre, $\alpha\beta$-heterodimere, transmembrane Glykoproteine – fungieren vornehmlich als Liganden für die Bindung an Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie</i>	
▪ MAC-1 (CD11b/CD18)	Leukozyten (PMN)
▪ LFA-1 (CD11a/CD18) lymphocyte-function-associated-antigen-1	Leukozyten (PMN)
▪ VLA-4 (CD94d/CD29) very-late-activating-antigen-4	Leukozyten (PMN)
Ig-Superfamilie <i>Transmembrane, endotheliale Glykoproteine mit Ig-ähnlicher Domäne – vermitteln die feste Bindung der Leukozyten an- und die Transmigration durch das Endothel</i>	
▪ ICAM-1 intercellular-adhesion-molecule-1 (CD54)	Endothelzellen
▪ ICAM-2 intercellular-adhesion-molecule-2	Endothelzellen
▪ ICAM-3 intercellular-adhesion-molecule-3	Endothelzellen
▪ VCAM-1 vascular-cell-adhesion-molecule-1 (CD106)	Endothelzellen

Bei den komplexen Zellinteraktionen der inflammatorischen Prozesse nehmen Adhäsionsmoleküle eine fundamentale Rolle ein [107,108]. Es handelt sich um transmembranäre Glykoproteine, die sich als Rezeptoren auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen, wie Monozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, befinden. Durch ihren Kontakt ermöglichen sie als Bindeglied zwischen Zelle und Zielzelle die Kommunikation der Zellsysteme.

Ihre molekularen Oberflächenstrukturen ragen ins Gefäßlumen, widersetzen sich den Scherkräften des Blutflusses und tragen zusätzlich zu den oben genannten

rheologischen Veränderungen zur Verlangsamung der Zirkulation bei – es entstehen lockere, reversible, über P- und L-Selektin vermittelte Verbindungen der Leukozyten mit dem Gefäßendothel und der Beginn einer in mehreren Schritten ablaufenden Adhäsionskaskade (siehe Abb. 5).

Abb. 5: **Adhäsionskaskade „rolling, sticking, transmigration“**

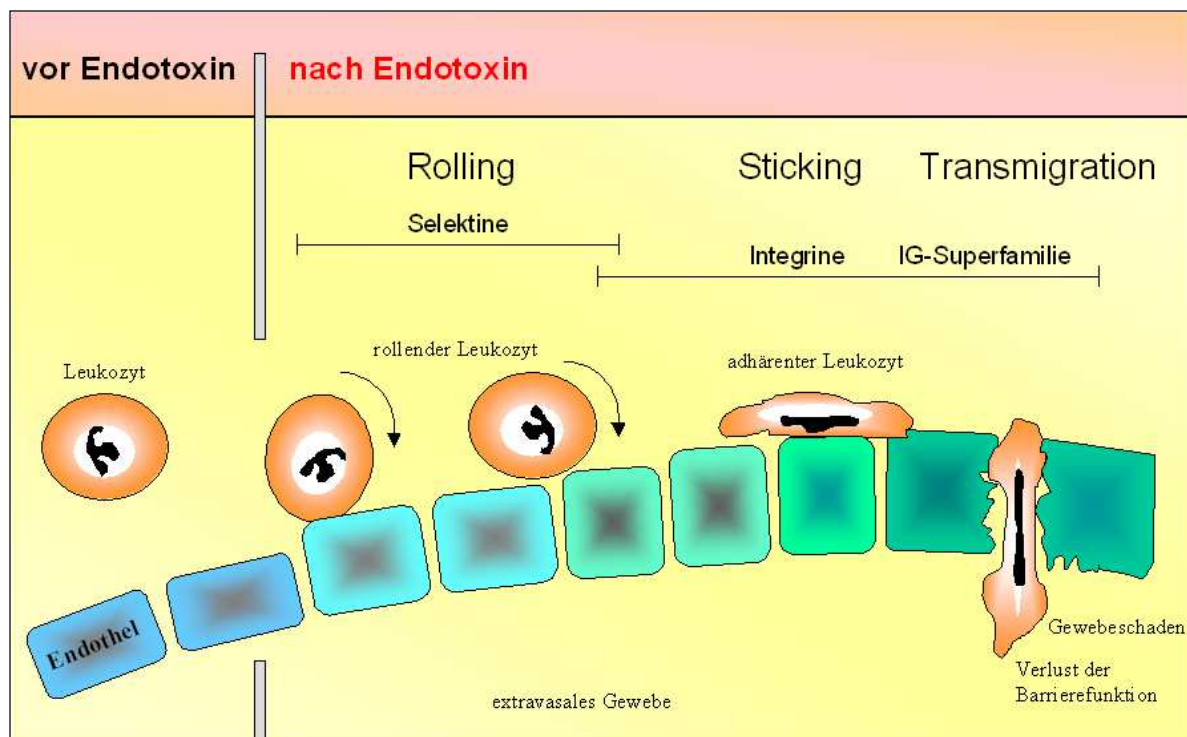


Abb. 5. Die Leukozyten-Adhäsionskaskade wird durch die gezielte Expression von endothelialen und leukozytären Adhäsionsmolekülen reguliert [107,108,113,119].

Teils ruckartig, teils von Endothel- zu Endothelzelle gleiten und rollen („rolling“) die neutrophilen Granulozyten (PMN) über die Oberfläche des Endothels, während die Expression von endothelialem E-Selektin die Roll-Geschwindigkeit der Granulozyten weiter reduziert. Es entsteht eine längere Kontaktzeit der Granulozyten mit dem Endothel, die eine Bindung der leukozytären oberflächlichen Integrin-Liganden CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (Mac-1) sowie VLA-4 an die endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 ermöglicht und in einer finalen Adhäsion („sticking“) der neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel resultiert. Dabei führt die Bindung der Integrin-Liganden ihrerseits zu einer gesteigerten Expressierung und schnellen Freisetzung von Integrinen aus zytoplasmatischen Granula an die Zelloberfläche und bewirkt eine erheblich festere Endotheladhäsion [113,119].

ICAM-1 wird auch von ruhenden Endothelzellen konstitutiv exprimiert, doch erfahren sie über inflammatorische Mediatoren, wie Zytokine und LPS, eine wesentliche, vom Transkriptionsfaktor „Nuklear Faktor kappa B“ (Nf-kB) abhängige, Expressionssteigerung und erreichen nach wenigen Stunden ihr Maximum [109,110]. Dabei haben klinische Studien gezeigt, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von ICAM-1 und VCAM-1 als prognostische Marker für die Entwicklung des MODS in neonataler und adulter Sepsis herangezogen werden können [111,112]. Sowohl die Behandlung mit monoklonalen ICAM-1-Antikörpern, als auch selektiven CD11b-Antikörpern konnte die Adhäsion und Emigration von neutrophilen Granulozyten reduzieren und unterstreicht die pathophysiologische Bedeutung der Adhäsionsmoleküle [115,117].

In einer Studie mit isolierten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut septischer Patienten – nicht aber von Kontrollpatienten - konnte eine Expressionszunahme von Integrinen, wie das very late antigen-4“ (VLA-4), nachgewiesen werden, die zu gesteigerter Adhäsivität an immobilisierten VCAM-1 Rezeptoren der Endothelzellen führte [118]. Neben Endothelzellen wird das Integrin VLA-4 auch von monozytären und eosinophilen Granulozyten exprimiert und scheint außer an der Bindung von VCAM-1 an der Akkumulation von monozytären und eosinophilen Zellen im Entzündungsgeschehen beteiligt zu sein [114].

Letztlich bleibt die präzise Rolle der Adhäsionsmoleküle in der Entwicklung des septischen Geschehens nur ansatzweise definiert.

Neben den Adhäsionsmolekülen tragen scheinbar weitere Faktoren wie Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) [105] und IL-8 zur Zelladhäsion am Endothel bei [106].

Über die Leukozytenadhärenz und resultierender Aktivierung des Endothels wird von einer Potenzierung der Stimulation und Hochregulation entzündungsmeditierender Stoffe mit Freisetzung lokal wirkender zytotoxischer Substanzen (z.B. Sauerstoffradikale, Proteasen) ausgegangen, die zu Verletzungen bzw. zum Verlust der Barrierefunktion des Endothels führen (capillary leak) und die folgende Transmigration („*emigration*“) der neutrophilen Granulozyten zwischen den Endothelzellen ins subendotheliale Bindegewebe erleichtern [120,121]. Unterstützt durch das Zusammenwirken weiterer Adhäsionsmoleküle wie PECAM (platelet endothelial adhesion molecule), $\alpha\text{v}\beta 3$ (alpha v. beta 3) und IAP (integrin associated protein) sowie VEGF (vascular endothelial growth factor) [122] treten neben Granulozyten weitere Blutbestandteile in die extrazelluläre Matrix gefolgt von intravasaler Flüssigkeit, die sich klinisch als interstitielles Ödem manifestiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Färbemethoden u.a. die Quantifizierung der ICAM-1- und VCAM-1-Expression am Endothel, sowie die

leukozytäre Expression von CD11b und ED1 als Marker der Makrophagen/Monozyten-Migration bestimmt.

2.5 Nuklear Faktor kappa B als zentraler Mediator der Immunantwort

Zahlreiche intrazelluläre LPS- und Zytokin-getriggerte ($\text{TNF}\alpha$ -, $\text{IL-1}\beta$) Signalwege konvergieren in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie nuclear factor-kappa B (NF- κ B), activator protein 1 (AP-1) und nuclear factor-interleukin 6 (NF-IL-6) (siehe Abbildung 6).

Transkriptionsfaktoren erlauben die Synthese von messenger-RNA durch Ablesen der im Zellkern befindlichen DNA.

NF- κ B ist der bekannteste Transkriptionsfaktor und wird in zahlreichen in vivo- und in vitro-Studien mit einer tragenden Funktion bei der Modulation und Pathophysiologie der Sepsis und des endotoxämischen Schocks in Zusammenhang gebracht. So steuert NF- κ B die zelluläre Gen-Expression von inflammatorischen Mediatoren, wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, Enzymen, Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) und der „inducible nitric oxide synthase“ (iNOS). Eine weitere Bedeutung wird der NF- κ B-Aktivierung bei Zellschäden durch oxidativen Stress, Ischämie und Reperfusionsschäden beigemessen [125].

Auf molekularer Ebene stellt sich NF- κ B in seiner aktiven DNA-bindenden Form als ein Dimer dar, bestehend aus Anteilen der Rel-Familie (RelA (p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52)) [125]. Als „classic NF- κ B“ wird der am häufigsten gefundene Heterodimer p65/p50 bezeichnet.

Im intrazellulären Zytoplasma liegt NF- κ B in seiner inaktiven Form durch die Bindung an ein inhibitorisches Protein der I κ B-Familie vor. Bis heute sind sieben verschiedene Vertreter der I κ B-Familie bekannt, die durch Maskierung der NF- κ B-Proteine seine Translokation verhindern. Über die Aktivierung des NF- κ B-Signalsoms, bestehend aus der „NF- κ B inducing kinase“ (NIK) und der „I κ B kinase“ (IKK), wird der NF- κ B/ I κ B-Komplex phosphoryliert [126]. Es folgt die Degradierung des inhibitorischen I κ B-Proteins mittels eines „Proteasom“, wodurch NF- κ B nun in den Zellkern transloziert und die Transkription der Sepsis-Mediatoren induziert. Dabei potenzieren ihrerseits exprimiertes $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ die Stimulation von NF- κ B, die letztlich zur Überexpression von zahlreichen sepsisinduzierenden Mediatoren mit den disaströsen Effekten des Multiorganversagens führen kann.

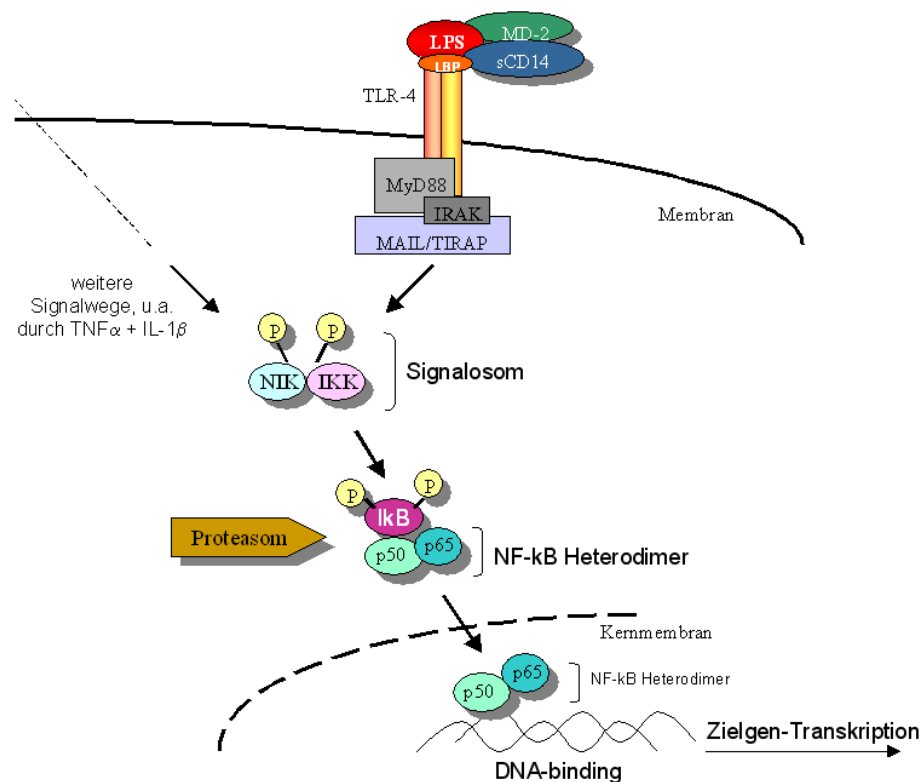
Abb. 6: **Signalweg über NF- κ B**

Abb. 6. Nach der Phosphorylierung von I κ B durch das Signalosom und der folgenden Degradierung transloziert NF- κ B in den Zellkern und führt zur Transkription des Zielgens [125,126]

Da diese pathophysiologischen Vorgänge die Endstrecke komplexer Inflamationsprozesse darstellen, erscheint deren therapeutische Blockade von großem Interesse für die intensivmedizinische Behandlung akut erkrankter Sepsispatienten.

2.6 Transmethylierungsprozesse und Wirkungsweise von c3ado

Eine Vielzahl intrazellulärer modulatorischer Reaktionsschritte bedürfen des Überganges einer Methylgruppe auf ein Reaktionsprodukt. Solche Transmethylierungsprozesse sind essentielle Vorgänge bei der Zelldifferenzierung, der Genexpression, beim Zellwachstum und wichtiger Bestandteil der Immunantwort.

Auf zellulärer Ebene wirkt *S-Adenosylmethionin* (SAM) als Methylgruppen-Donator für die enzymatische Methylierung von zahlreichen kleinen Molekülen, Proteinen, Phospholipiden und Nukleinsäuren. *S-Adenosyl-Homocystein* (SAH), das während der

Transmethylierung entsteht, inhibiert seine eigene Generation durch einen negativen Feedback- Mechanismus. Eine intrazelluläre Akkumulation von SAH bringt damit Methylierungsprozesse zum Erliegen und entfaltet als Konsequenz u.a. eine immunmodulatorische Wirkung. Über ihr spezifisches Enzym S-Adenosyl-Homocystein-hydrolase (SAH-hydrolase) wird SAH schliesslich in Adenosin und Homocystein gespalten (siehe Abb. 7).

Abb. 7: Methylierungsreaktion

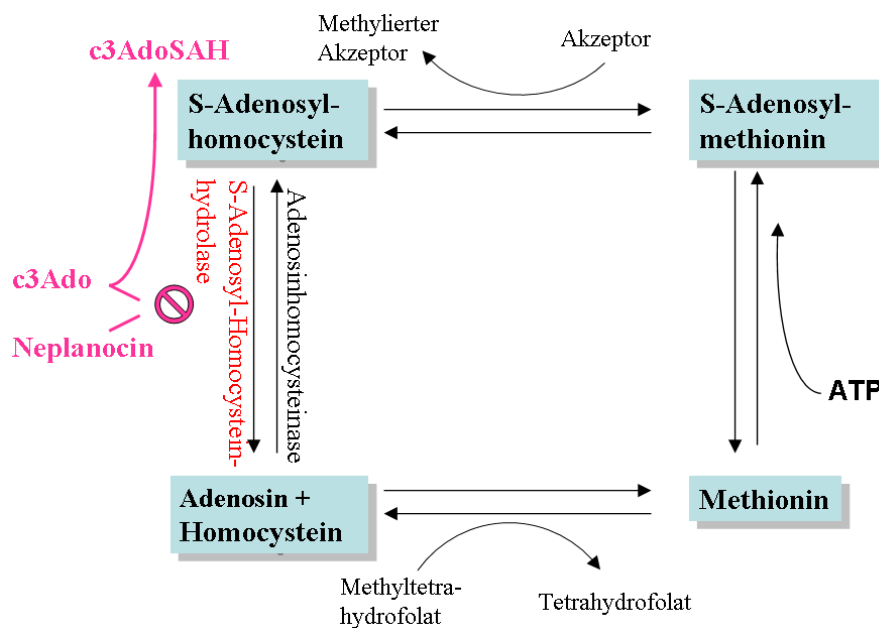


Abb. 7. Sowohl c3ado als auch Neplanocin sind als Inhibitoren der S-Adenosyl-Homocystein-hydrolase (SAH-hydrolase) bekannt. Während c3ado reversibel die enzymgerichtete Reaktion der SAH-hydrolase hemmt und gleichzeitig als Substrat für c3adoSAH dient, fungiert Neplanocin als irreversibler Enzyminhibitor. Durch die Enzymhemmung wird das Reaktionsgleichgewicht zum SAH verschoben, wodurch die zellulären Methyltransferasen und somit Methylierungsreaktionen blockiert werden. Modifiziert nach: Philipp Christen, Rolf Jaussi. *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*. Springer Verlag. 2005.

Seitdem im Jahre 1963 Mann und Mudd [127] Transmethylierungsprozesse durch die Anwesenheit von SAH, als kompetitiver Inhibitor des Enzymes *tyramin N-methyltransferase*, blockieren konnten, begann die Suche nach einem synthetischen Analogpräparat, das die immunmodulatorischen und antiinflammatorischen Eigenschaften von SAH in ähnlich effizienter Weise vereinigt. Die meisten Analoga

stellten sich allerdings als weniger potent dar, so dass die Entwicklung eines Enzyminhibitors der *SAH-hydrolase* favorisiert wurde, dessen Einsatz ebenso die intrazelluläre Akkumulation von *SAH* hervorrief und in der erhofften Blockierung verschiedener Transmethylierungsprozesse resultierte. Chiang et al. fanden schliesslich in dem strukturellen Analogon zu Adenosin einen potenten Inhibitor der *SAH-hydrolase* mit der Bezeichnung „3-Deazaadenosin“ (*c3ado*) [128].

Abb. 8: Strukturformel

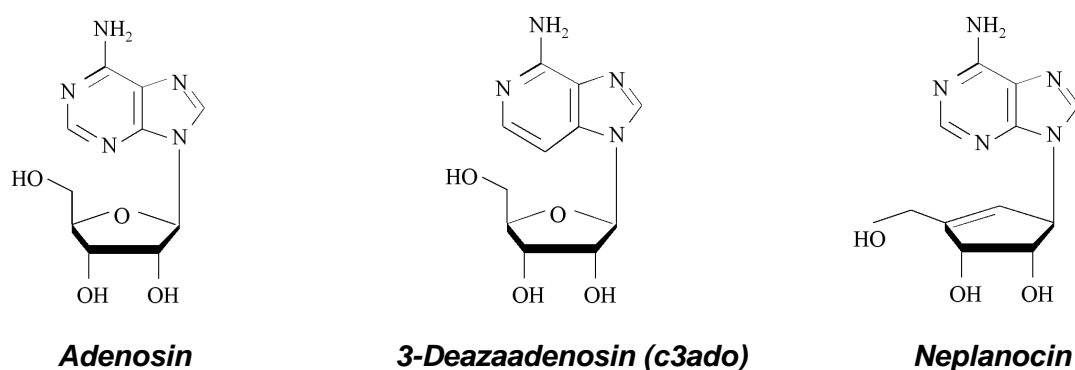


Abb. 8. Inhibitoren der *SAH-hydrolase*, neben Adenosin bewirkt der Einsatz des Strukturanalogs 3-Deazadenosin sowie Neplanocin eine Blockade des Transmethylierungsprozesses. Strukturformel nach: Gerhard Habermehl, Peter E. Hammann, Hans Christoph Krebs, W Terne. Springer Verlag, *Naturstoffchemie: Eine Einführung*, 3. Auflage, 2008.

Im Gegensatz zu weiteren, später gefundenen Analoga, wie z.B. Neplanocin, wirkt *c3ado* dabei nicht nur als Inhibitor, sondern ebenso als Substrat der *SAH-hydrolase*, wodurch sich neben der Akkumulation von *SAH* ein simultan erhöhter Serumspiegel an 3-deaza-*SAH* nachweisen lässt [129], der seinerseits in einer Blockade von Transmethylierungsprozessen endet [130].

Klinische Studien der vergangenen Jahre weisen auf eine Reihe von *c3ado* ausgehenden inhibitorischen Effekten hin, insbesondere bei der Chemotaxis und Phagozytose von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen [62,65-67,131-133], bei der lymphozyten-vermittelten Zytolyse [64] und der Superoxid-Anionen-Generation [68,69].

Die Untersuchungen von Jurgensen et al. [71] zeigten weiterhin, dass 3-Deazaadenosin die Leukozyten-Adhäsion sowie die Biosynthese des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in $\text{TNF}\alpha$ -stimulierten Endothelzellen inhibiert. Dabei agiert

c3ado selektiv an Endothelzellen und reduziert die $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation der ICAM-1-Expression auf basalen bis möglicherweise subbasalen Spiegel. In diesem Zusammenhang konnten Walker et al. die durch *c3ado* gehemmte in-vitro und in-vivo Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1 am Mausmodell demonstrieren [136].

Interessanterweise konnte durch die Untersuchungen von Jeong et al [137] ebenso die Inhibition der Transkriptionsaktivität von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ mittels *c3ado* gezeigt, sowie die Hemmung der LPS-induzierten Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 nachgewiesen werden [138,139].

c3ado wird ebenso eine antivirale Wirkung gegen das Herpes simplex Virus, das Ebola Virus und das humane Immundefizienz-Virus beigemessen [140-142].

Diagramm 5: Eigenschaften von 3-Deazaadenosin (*c3ado*)

- Hemmung der Chemotaxis von Makrophagen und Neutrophilen [62]
- Hemmung der Lymphozyten-vermittelten Zytolyse [64]
- Hemmung der Makrophagen-Phagozytose [62,65-67]
- Hemmung der Superoxid-Anionen-Generation [68,69]
- Hemmung der Leukozytenadhäsion und Biosynthese von ICAM-1 [71]
- Hemmung der IL-1-Produktion in Makrophagen [139]
- Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion [138]
- Hemmung der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Transkriptionsaktivität [137]
- Hemmung der Tissue Factor-Produktion [165]
- Hemmung des PDGF (platelet derived growth factor) [135]
- Hemmung von ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule-1) [135]
- Hemmung von ICAM + VCAM [136]
- Induktion der Disorganisation von Makrophagen-Mikrofilamenten [66]
- Antivirale Wirkung gegen das Herpes simplex Virus, das Ebola Virus und das humane Immundefizienz-Virus [140-142]
- Verminderung des Homocystein-Spiegels [143]

Trotz der zahlreichen Erkenntnisse über die antiinflammatorischen und -modulatorischen Eigenschaften von *c3ado* und seiner Anwendung in klinischen

Studien als therapeutisches Agens (z.B. bei Rheumatoider Arthritis) bleibt der molekulare Mechanismus der zugrunde liegenden differenzierten Wirkungsbreite nur ansatzweise verstanden. Die Hemmung der zellulären Methylierungsreaktion durch *c3ado* wird als ein möglicher Erklärungsansatz seiner inhibitorischen Aktivität angesehen [133], doch wird in der Literatur von einigen Autoren auch auf den Nachweis methylierungs-unabhängiger Wirkungen von *c3ado* hingewiesen [131,134], wie z.B. die Disorganisation von intrazellulären Mikrofilamenten von Makrophagen und folgender Beeinträchtigung der Phagozytose [66].

In der vorliegenden Arbeit wird der therapeutische Effekt von *c3ado* mit den Ergebnissen eines weiteren Methylierungsinhibitors, *Neplanocin A*, verglichen, der im folgenden näher beschrieben wird.

2.7 Neplanocin A als irreversibler Inhibitor der Transmethylierung

In den vergangenen drei Jahrzehnten war die Identifikation und Synthese neuer Methylierungsinhibitoren Bestandteil intensiver Forschung. So wurde u.a. 1979 das in der Natur vorkommende Neplanocin A aus dem Kulturfiltrat des Erdpilzes *Ampullariella regularis* isoliert. Es handelt sich um das Cyclopentenylanalogon des Adenosins, ein karbozyklisches Nucleosid mit hoher Resistenz gegenüber Phosphorylasen – eine Eigenschaft, mit der sich Neplanocin als ein vermindert zytotoxischer Vertreter der Methylierungsinhibitoren mit potenter antiviraler Wirkung herausstellte [144]. Bekannt wurde Neplanocin A durch seine signifikante Antitumor-Aktivität gegen L1210 Leukämie [145] sowie antiviraler Aktivität gegen eine Reihe von RNA- und DNA-Viren, wie das Vaccina Virus [146], Reovirus [147] und Human Rotavirus [148]. Seine antivirale Wirkung wird vornehmlich mit der Blockierung von Transmethylierungsprozessen über die irreversible Hemmung der *SAH-hydrolase* in Verbindung gebracht [146].

2.8 Herleitung der Fragestellung, vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe und Ziel dieser Arbeit

In 40% der septischen Patienten sind Beeinträchtigungen des kardiovaskulären Systems nachzuweisen [7,8]. Die Mortalitätsrate steigt von 20-30% bei septischen

Patienten ohne kardiovaskuläre Dysfunktion auf 40-70% bei septischem Schockzustand [7,8]. Diese Tatsache hat sich in den vergangenen Jahren nur wenig verändert.

In den vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurden von Dietrich und Schoaff bereits kardiale Veränderungen am sepsisinduzierten Tiermodell beobachtet und ein möglicher Therapieansatz mittels 3-Deazaadenosin vorgestellt [153].

Anhand zahlreicher Untersuchungen gelang der Nachweis, dass 3-Deazaadenosin in fixierter Dosierung die Endotoxin-vermittelte Kardiomyopathie an Rattenherzen zu verhindern vermag.

Über die Verwendung von Herzfunktionsparametern wie linksventrikulärem Druck, linksventrikulärer Druckanstiegsgeschwindigkeit und Perfusionsdruck gelang es, die kardiale Beeinträchtigung der LPS induzierten Sepsis zu manifestieren und die kardioprotektive Wirkung von 3-Deazaadenosin zu dokumentieren [153]. Ebenso Blutbildveränderungen wie die für die bakteriell ausgelöste Sepsis charakteristische Linksverschiebung und der Konzentrationsanstieg an plasmatischem TNF- α waren durch 3-Deazaadenosin signifikant geringer ausgefallen. Intravitalmikroskopische Untersuchungen konnten zudem eine durch 3-Deazaadenosin induzierte deutlich verminderte leukozytäre Adhärenz und Diapedese aufzeigen mit der Folge einer verminderten Myokardinfiltration aktivierter Leukozyten und einer konsekutiv signifikant reduzierten Produktion an Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen (ROS). Über immunhistochemische Färbungen, wie gegen CD11b, ED1 und gp91phox, ließ sich die hemmende Wirkung von 3-Deazaadenosin auf die Leukozytenmigration bestätigen. Darüber hinaus gelang es einen inhibitorischen Effekt von 3-Deazaadenosin auf die Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B als einen zentralen Entzündungsmediator aufzuzeigen [153].

Obwohl die Auswirkungen der Sepsis auf die kardiale Funktion ebenso in vielen weiteren wissenschaftlichen Versuchen untersucht wurden, blieben sie auch hier weiterhin komplexer Natur und vielfach unverstanden. Ziel dieser Arbeit ist daher zum einen die Darstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung von 3-Deazaadenosin am Sepsis-induzierten Tiermodell. Zum anderen soll ein Erklärungsansatz der möglichen Wirkungsweise von 3-Deazaadenosin über die Verwendung des Methylierungs-Inhibitors Neplanocin beleuchtet und überprüft werden.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Tierhaltung

Für die Durchführung der Versuche wurden ausnahmslos männliche Wistar-Ratten der Firma Charles and River (Sulzfeld, Deutschland) in einer Gewichtsklasse von 200 – 250 g verwendet.

3.2 Versuchsplanung und Festlegung der Konditionen

168 männliche Wistar-Ratten wurden zufällig gemäß der Versuchsfragestellung mit einem Körpergewicht zwischen 200-250 g in 14 Versuchsgruppen eingeteilt. Durch die jeweils unterschiedlich konditionierten Behandlungsschemata sollte ein möglicher Konzentrations-Wirkungsunterschied von c3ado sowie ein potentieller Pathomechanismus der septischen Kardiomyopathie beleuchtet werden. Für letzteres wurde zusätzlich der Methylierungs-Inhibitor Neplanocin (Nepl) verwendet. Die Festlegung der Versuchsgruppen erfolgte wie folgt:

- **Gruppe 1** = Kontrolle
- **Gruppe 2** = Lipopolysaccharid (LPS) 1mg/kg KG
- **Gruppe 3** = LPS 1mg/kg KG + c3ado 100 µg/kg KG
- **Gruppe 4** = LPS 1mg/kg KG + c3ado 1 mg/kg KG
- **Gruppe 5** = LPS 1mg/kg KG + c3ado 5 mg/kg KG
- **Gruppe 6** = LPS 1mg/kg KG + c3ado 10 mg/kg KG
- **Gruppe 7** = c3ado 100 µg/kg KG
- **Gruppe 8** = c3ado 1 mg/kg KG
- **Gruppe 9** = c3ado 5 mg/kg KG
- **Gruppe 10** = c3ado 10 mg/kg KG
- **Gruppe 11** = Neplanocin (Nepl) 1 mg/kg KG
- **Gruppe 12** = Nepl 10 mg/kg KG
- **Gruppe 13** = LPS 1mg/kg KG + Nepl 1 mg/kg KG
- **Gruppe 14** = LPS 1mg/kg KG + Nepl 10 mg/kg KG

Gruppe 1 (Kontrolle)

stellt die Kontrollgruppe des Versuches dar. Den Ratten dieser Gruppe wurde anstelle eines Pharmakons zum Zeitpunkt $t = 0$ h und $t = 4$ h intraperitoneal physiologische Kochsalzlösung (NaCl) gespritzt.

Gruppe 2 (Lipopolysaccharid = LPS)

Den Tieren wurden einmalig Lipopolysaccharid (LPS) (Sigma L-2630) zum Zeitpunkt $t = 0$ h mit der Konzentration 1 mg pro kg Körpergewicht, gelöst in NaCl, intraperitoneal verabreicht, gefolgt von einer reinen NaCl-Injektion zum Zeitpunkt $t = 4$ h. Die ermittelten Daten innerhalb dieser Gruppe sollten als Ausgangswerte im Vergleich mit Therapiegruppen dienen.

Gruppe 3 bis 14

Bei den folgenden 12 Gruppen handelt es sich um Therapiegruppen, innerhalb dieser die Ratten entweder mit c3ado oder Neplanocin mit unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden. Bei der Hälfte dieser Gruppen wurde zusätzlich LPS injiziert, um eine mögliche direkte Therapiewirkung zu untersuchen.

Gruppen 3 bis 6 (LPS+ c3ado)

Für die Tiere dieser Gruppen wurde die intraperitoneale Injektion der konstanten Menge LPS (Sigma L-2630) (= 1 mg pro kg Körpergewicht) zum Zeitpunkt $t = 0$ h sowie die Injektion von c3ado festgelegt. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen kurzen Halbwertszeit von c3ado [168] wurde, wie bereits in der vorausgegangenen Studie von Schoarf und Dietrich, eine zweimalige Gabe von c3ado zu den Zeitpunkten $t = -30$ min (= halbe Stunde vor LPS-Injektion) und $t = 4$ h gewählt. Mit der Vorabinjektion von c3Ado zum Zeitpunkt $t = -30$ min sollte zum einen ein ausreichender Serumspiegel an c3ado gesichert sein, zum anderen eine potentielle Interaktion bei gleichzeitiger LPS-Gabe vermieden werden. In der Studie von Schoarf und Dietrich erwies sich die Dosierung von 10 mg c3ado pro kg Körpergewicht als kardioprotektiv und effektiv in der Prävention der septischen Kardiomyopathie. Gemäß der Versuchsfragestellung dieser Studie im Hinblick auf eine Dosis-Wirkungsbeziehung und einer optimierten Therapieeffizienz wurde den Ratten unterschiedliche c3ado-Konzentrationen, wie anhand der Gruppeneinteilung ersichtlich, verabreicht.

Gruppen 7 bis 10 (c3ado-Monotherapie)

Den Tieren dieser Gruppen wurden die unterschiedlichen c3ado-Konzentrationen ohne LPS-Gabe zu den bekannten Zeitpunkten $t = -30 \text{ min}$ und $t = 4 \text{ h}$ zugeführt.

Gruppen 11 bis 14 (Gruppe 11+12 Neplanocin-Monotherapie) (Gruppe 13+14 Neplanocin + LPS)

Bei den Ratten dieser Gruppen kam das Medikament Neplanocin anstelle von c3Ado zur Anwendung. Die zweimalige intraperitoneale Injektion von Neplanocin gelöst in NaCl mit den Konzentrationen 1 mg und 10 mg pro kg Körpergewicht wurde ebenfalls auf die Zeitpunkte $t = -30 \text{ min}$ und $t = 4 \text{ h}$ festgelegt. Analog zu den c3ado-Gruppen wurden die Neplanocin-Gruppen jeweils mit und ohne LPS-Gabe behandelt.

Bei allen Gruppen wurde die intraperitoneale Gesamtfüssigkeitsgabe auf 2 ml begrenzt. Während der Versuchsdauer bestand für die Tiere keine orale Futter- oder Wasserrestriktion. Nach $t = 8 \text{ h}$ wurden die Tiere zur venösen Blutentnahme und Explantation präpariert.

Abb. 9: Prämedikation / Explantation

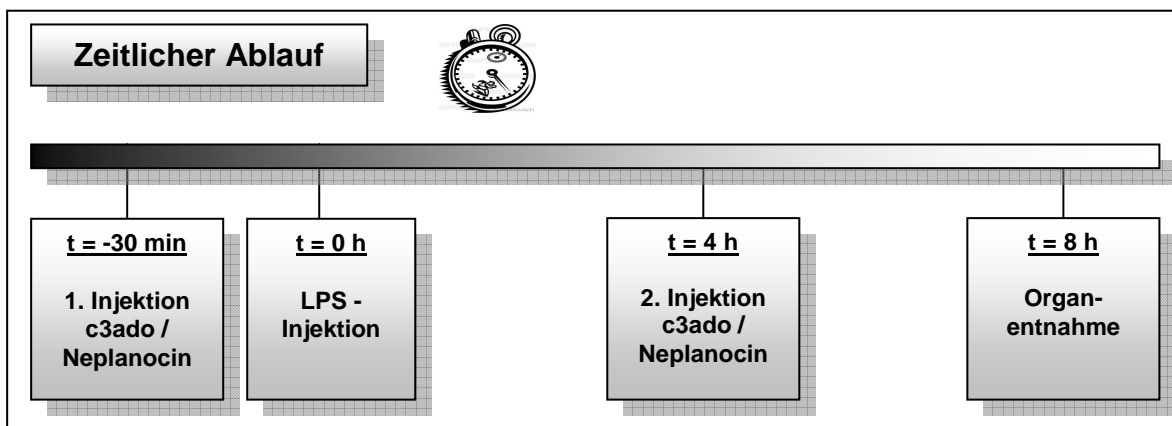


Abb. 9 veranschaulicht den zeitlichen Ablauf der Tierbehandlung

3.3 Blutgewinnung und Organentnahme

Mittels einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (Florene®) in einem abgedichteten Behälter wurden die Tiere zunächst nach Wirkung betäubt gefolgt von einer intraperitonealen Injektion mit Pentobarbital (Nembutal®) in einer Dosierung von 0,35 g/kg Körpergewicht. Zur Prophylaxe einer intrakoronaren Thrombenbildung wurde

Heparin (Liquemin® 1000 IU/kg Körpergewicht) ebenfalls intraperitoneal appliziert. In tiefer Narkose wurde die Bauchwand bis zum Zwerchfell eröffnet, die Vena cava inferior zur Blutentnahme freigelegt und 3 ml venöses Blut entnommen. Das Zwerchfell wurde beidseits durchtrennt, eine bilaterale Thorakotomie entlang der Medianlinie durchgeführt und der Thorax nach kranial aufgeklappt. Nach Eröffnen des Perikards und Freilegung der großen Gefäße wurde die Aorta bei Erhaltung eines ausreichend langen Gefäßstumpfes durchtrennt, das Herz entnommen und für die weitere Perfusions- und immunhistochemische Untersuchung verwendet.

3.3.2 Bestimmung der Blutwerte

Das vor der Organentnahme gewonnene venöse Blut der Versuchstiere (n=12 pro Versuchsgruppe) wurde durch freundliche Mitarbeit des Hämatologischen Instituts des Uni-Klinikums Gießen und Marburg bearbeitet. Durch eine erfahrene MTA der klinisch-hämatologischen Labordiagnostik wurde ein großes Blutbild und ein Differentialblutbild erstellt und die folgenden Blutwerte erhoben: Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Hämatokrit und Hämoglobulin, sowie die prozentuale Angabe von Lymphozyten, segment- und stabkernigen Granulozyten, Monozyten und Eosinophilen. Des Weiteren wurde mit der verbleibenden Blutmenge der LDH-Wert bestimmt.

3.3.1 Verwendete Pharmaka bei der Vorbehandlung und Organentnahme

- NaCl 0,9% B. Braun (Braun Melsungen, Deutschland)
- Lipopolysaccharide L-2630 vom E.coli Serotype O111:B4 (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland)
- 3-Deazaadenosin (c3ado) (Southern Research Institute, Birmingham, AL, USA)
- Neplanocin (Research Laboratory, Toyo Jozo Co, Shizuoka-Ken, Japan)
- Isoflurane (Florene®), (Abbott, Wiesbaden, Deutschland)
- Pentobarbital-Natrium (Nembutal®) (Sanofi CEVA, Düsseldorf, Deutschland)
- Natriumhydrogencarbonat 8,4% (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland)
- Elektrolytlösung I/3 (Serag-Wiessner, Naila, Deutschland)
- Suprarenin Ampullen 1:1000 (Aventis, Frankfurt, Deutschland)
- Heparin (Liquemin® N 5000 Ampullen), (Hofmann - La Roche, Grenzach, Deutschland)

3.4 Modell der Organperfusion

Das in dieser Studie verwendete Perfusionschema isolierter Rattenherzen wurde nach dem von O. Langendorff 1895 erstbeschriebenen Modell durchgeführt. Dabei handelt sich hierbei um eine Perfusion des Rattenherzens, die zunächst retrograd über den fixierten Aortenstumpf und dann anterograd bei intakter geschlossener Aortenklappe über die Koronarostien in die koronare Gefäßstrombahn erfolgt. Der Einstrom führt zu einem perfundierten Myokard mit rhythmischen Kontraktionen des Herzmuskels. Mit der Organentnahme wurde das Herz von zentralvegetativen, metabolischen und humoralen Einflüssen des Gesamtorganismus getrennt, so dass mit diesem Modell Reaktionsparameter des Herzens auf spezifisch definierte Stimuli aufgezeichnet werden können.

3.4.1 Versuchsaufbau und Durchführung der Organperfusion

Direkt nach der Organentnahme wurde das Herz in eine eisgekühlte kardioplege Krebs-Henseleit-Perfusionslösung gelegt. Größere Gefäßstümpfe der Lungenvenen, Perikard- und Thymusreste wurden reseziert, um einen freien Zugang zum linken Vorhof zu sichern. Nun wurde die Aorta des Herzens, mit ausreichend verbleibender Gefäßlänge an der Aortenkanüle der Perfusionsapparatur legiert, das Herz mit 37,5 °C warmer Perfusionslösung perfundiert und in die Organkammer eingebracht.

Um das isolierte Herz von Blutresten zu befreien, wurde es nach der Fixierung an der Aortenkanüle mit 150 ml Perfusatlösung perfundiert. Für die Durchführung der Organperfusion wählten wir den Aufbau eines geschlossenen flusskonstanten Perfusionsmodells. Bei diesem Modell wurde das Rattenherz mittels einer Rollerpumpe (MS-4 Reglo 8-100, Ismatec) mit einer festgesetzten rezirkulierenden Perfusatmenge von 10 ml Elektrolytlösung pro Gramm Herzgewicht und Minute über den Aortenstumpf perfundiert. Dieses Verfahren bietet gegenüber dem offenen Flußsystem die Vorteile der Anreicherung von Metaboliten im rezirkulierenden Perfusat und den Einsatz reduzierter Medikamentendosierungen.

Als Perfusat wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung verwendet die folgende Zusammensetzung aufwies: Calciumchlorid-Dihydrat 2,4 mmol/l, Magnesiumchlorid-Hexahydrat 1,3 mmol/l, Kaliumchlorid 4,3 mmol/l, Kalium-dihydrogenphosphat 1,1 mmol/l, Natriumchlorid 125 mmol/l, Natriumhydrogencarbonat 25 mmol/l und Glukose 13,32 mmol/l.

Mit Hilfe eines Oxygenators wurde das Perfusat kontinuierlich mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, womit pO₂ bei 550 ± 50 mmHg und pCO₂ bei 35 ± 5 mmHg konstant gehalten wurden. Der pH-Wert der Lösung lag in einem Bereich von $7,40 \pm 0,04$. Über ein thermostatgesteuertes Wärmebad (Julabo 8A/UC, Julabo) konnte die Perfusatemperatur auf konstante physiologische 37,5 ° C reguliert werden. Der Abfluß der Perfusatlösung aus dem Herzen erfolgte nach Durchfluß der Koronargefäße über die Herzhohlen und die durchtrennten Herzgefäße. Mittels der umgebenen Organkammer wurde das abtropfende Perfusat gesammelt und nach Zwischenschaltung eines Mikrofilters über eine zweite Rollerpumpe erneut dem Perfusatgefäß zugeführt, oxygeniert und wieder in den Herzkreislauf gepumpt. Der Mikrofilter mit einer Porengröße von 15 µm diente dazu, um etwaige Elektrolytkristalle von der Koronarstrombahn fernzuhalten.

Abb. 10: Perfusionsmodell nach Langendorff

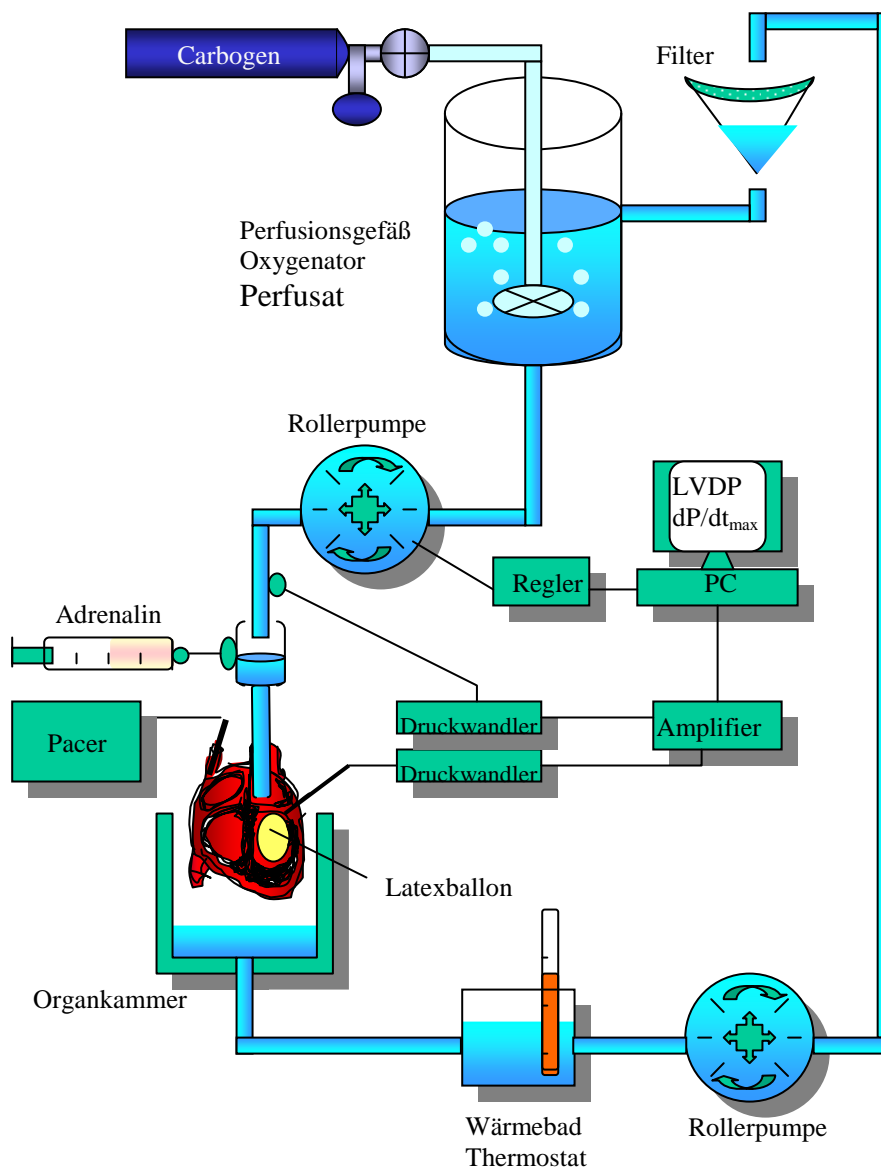


Abb. 10 stellt den schematischen Versuchsaufbau der Organperfusion nach Langendorff dar. Das in der Organkammer befestigte Rattenherz wird über eine in den Aortenstumpf eingebrachte Kanüle retrograd mit oxigenierter (Oxygenator) Elektrolytlösung perfundiert. Mit Hilfe eines thermostatgesteuerten Wärmebades wird die Temperatur der Perfusionslösung und Organkammer konstant gehalten. Über einen Pacer, eine im Bereich des rechten Vorhofs angelegte Schrittmacherelektrode, wird das Herz stimuliert. Während des Versuchsablaufs wird über eine Perfusorspritze Adrenalin dem Perfusat beigemischt. Der Perfusionsdruck wird über einen Druckwandler kontinuierlich ermittelt, während der in den linken Ventrikel vorgeschobene Latexballon mit Hilfe einer Computersoftware die Aufzeichnung der myokardialen Funktionsparameter LVDP und dP/dt_{\max} ermöglicht.

3.4.2 Messung der myokardialen Funktionsparameter

Um die Kontraktilität des Herzens beurteilen zu können wurde nach Anschluss des Herzens über die durchtrennten Lungenvenen und den linken Vorhof ein Latexballon (Hugo Sachs Elektronik) in den linken Ventrikel vorgeschoben. Dieser Latexballon wurde soweit mit destilliertem Wasser gefüllt bis er dem Volumen des linken Ventrikels angepasst und ein enddiastolischer Druck von 6 mmHg eingestellt werden konnte. Über einen Druckaufnehmer (Combitrans, B.Braun) sowie einem 2-Kanal-Brückenverstärker (Typ 301, Hugo Sachs Elektronik) gelang es den Latexballon mit der computergesteuerten Messapparatur (MacLab/8 und Power Mac 6100/60) zu verbinden. Dadurch war es möglich die isovolumetrischen Kontraktionen des Herzens mittels einer Software (Chart Version 3.6.5) aufzuzeichnen und den linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP = left ventricular developed pressure) zu ermitteln. Dieser ergab sich aus der Differenz zwischen linksventrikulär endsystolischen und enddiastolischen Druckwerten. Darüber hinaus ließ sich die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit dP/dt_{\max} als weiterer Kontraktilitätsparameter bestimmen. Über einen separaten Druckaufnehmer im Koronargefäß wurde der koronare Perfusionsdruck (CPP) bei flußkonstantem Perfusionsmodell erfasst und der Widerstand in der koronaren Gefäßstrombahn ermittelt.

Obwohl das isoliert perfundierte Herz eine spontane Herzschlagrhythmik aufwies, wurde eine mit einem Pacer (Stimulator P Typ 201, Hugo Sachs Elektronik) verbundene bipolare Schrittmacherelektrode im rechten Vorhof eingesetzt. Dieser Eingriff führte zur Reduktion des Einflusses frequenzbedingter Kontraktilitätsschwankungen während der gesamten Versuchsdauer und zur Stabilisierung der Herzfrequenz von 300-360 Schläge/min.

Das folgende Verfahren wurde als standardisiertes Versuchsprotokoll etabliert und gibt einen Überblick über den erfolgten Versuchsablauf:

- Befestigung des Rattenherzens an der Aortenkanüle und Einführung des Latexballons in den linken Ventrikel.
- Offene Perfusion mit 150 ml Perfusatlösung.
- Start der geschlossenen, flusskonstanten Organperfusion mit 10 ml rezirkulierender Elektrolytlösung pro Gramm Herzgewicht und Minute.
- Einbringung der Schrittmacherelektrode in den rechten Vorhof .
- 15 Minuten Einstellungsphase bis zum Erreichen stabiler Werte.
- Ermittlung der Referenzwerte für koronaren Perfusionsdruck (CPP), LVDP und dP/dt_{\max} (definierter Messzeitpunkt 1).
- Stimulation des Rattenherzens über 30 Minuten mit einer Adrenalin-Perfusat-Konzentration von 0,2 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin (Suprarenin).
- Definierter Messzeitpunkt 2 nach 15 Minuten Katecholaminstimulation.
- Definierter Messzeitpunkt 3 nach 30 Minuten Katecholaminstimulation und Stop der Katecholaminzufuhr.
- Definierter Messzeitpunkt 4 nach weiteren 15 Minuten und Ende des Versuchs.

3.4.3 Material für die Organperfusion nach Langendorff

- Carbogen Gas (Messer, Griesheim, Deutschland)
- Stimulator P Typ 201 sowie bipolare Stimulatorelektrode (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Oxygenator/Perfusatgefäß aus doppelwandigem Glas (Hohlglas, Lich, Deutschland)
- Organkammer aus Glas (Hohlglas, Lich, Deutschland)
- Aortenkanüle, Innendurchmesser 1,5 mm, Außendurchmesser 2 mm (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Rollerpumpe MS-4 Reglo 8-100 (Ismatec, Glattbrugg, Schweiz)
- Wärmebad Julabo 8A/UC (Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland)
- Perfusorspritzenpumpe Secura (Braun, Melsungen, Deutschland)

3.4.4 Datenerhebung & -verarbeitung der myokardialen Funktionsparameter

- 2-Kanal-Brückenverstärker Typ 301 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Latexballon (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland)
- Druckaufnehmer Combitrans (Braun, Melsungen, Deutschland)

- Power Macintosh 6100/60 (Apple Computer, Feldkirchen, Deutschland)
- MacLab/8 (ADInstruments, Spechbach, Deutschland)
- Auswertungssoftware MacLab Chart Version 3.6.5 (WissTech, Spechbach, Deutschland)

3.5 Immunhistochemie

3.5.1 Präparation und Aufbewahrung

Für die immunhistochemische Untersuchung des entnommenen Herzgewebes wird die Präparation und Aufarbeitung des Gewebes notwendig.

Ausgehend von der wie oben beschriebenen erfolgten Organentnahme wurde dafür das Herz zunächst von Geweberesten wie Thymus und Perikard befreit und in drei Abschnitte, wie folgt, geteilt:

- Herzbasis, die Vorhöfe und Basis der Ventrikel integriert
- Herzmitte, die die Mitte der Ventrikel umfasst
- Herzapex, Bereich der Herzspitze

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurde lediglich die Herzmitte verwendet, welche zunächst zur weiteren Aufarbeitung auf einer Korkplatte in Tissue Tek (O.C.T. Compound, SAKURA, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und im nächsten Schritt schockgefroren wurde. Um das Auftreten von Artefakten beim Gefrierprozess zu minimieren wurde die Herzmitte in 2-Methylbutan (Isopentan, FLUKA-Chemika, Buchs, CH) gehalten, das kurz zuvor mittels flüssigen Stickstoff nahe des Gefrierpunktes abgekühlt wurde. Bis zur Anfertigung von Gefrierschnitten erfolgte die weitere Aufbewahrung des Herzgewebes bei einer Gefriertemperatur von -80 ° Celsius.

3.5.2 Gefrierschnitte mit dem Kryostat

Im folgenden Arbeitsschritt wurden vom Herzgewebe wenige Mikrometer dünne Gefrierschnitte angefertigt. Die tiefgefrorene Herzmitte wurde dabei mitsamt der Korkplatte auf einem Träger im Kryostat (LEICA CM 1900, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) mit einer Schnittdicke von 6 µm eingespannt und auf eine

Bearbeitungstemperatur von 4 ° Celsius eingestellt. Die angefertigten Gefrierschnitte wurden auf beschriftete Objektträger (Super Frost Plus – Menzel Gläser) aufgezogen und bis zur immunhistochemischen Verarbeitung bei konstanten -80 ° Celsius aufbewahrt.

3.5.3 Grundlagen der Immunhistochemie

Grundlegendes Ziel der Immunhistochemie ist es über Detektionsverfahren Zellen oder Gewebe differentialdiagnostisch zu identifizieren. Verschiedene Färbungsmethoden stehen dabei zur Verfügung, mit denen antigene Komponenten der Gewebeschnitte oder Zellen hervorgehoben werden. Dies geschieht mit spezifischen Antikörpern (Ak), die gegen das gesuchte Antigen (Ag) gerichtet sind. Als primäre Antikörper werden heutzutage im Wesentlichen monoklonale Antikörper verwendet. Diese werden aus Zellkulturen von immortalen Zellstämmen gewonnen und lassen sich so in unbeschränkter Menge gewinnen. Da isolierte „Ag-Ak-Komplexe“ schwer in Zellsuspensionen oder Gewebeverbänden nachweisbar sind, werden diese spezifischen Antikörper mit einem Marker wie z.B. Fluoreszenzfarbstoffen, Enzymen, partikulärem Material (z.B. Goldpartikel) oder radioaktive Isotope versehen und so im mikroskopischen Bild farblich hervorgehoben. Dabei lässt sich eine direkte von einer indirekten Methode unterscheiden. Bei der direkten Methode ist der Primärantikörper mit einem Marker konjugiert. Sie ist weniger sensibel und findet vornehmlich dann Verwendung, wenn das gesuchte Antigen in großer Menge vorliegt. Zwecks Signalverstärkung erfolgt der Nachweis bei der sensibleren indirekten Methode über einen weiteren Antikörper, den Sekundärantikörper, der an den Primärantikörper bindet. Über die Verästelung der Antikörperkette erhöht sich die Zahl der Bindungsstellen und letztlich die Sensitivität des Detektionsverfahrens. Voraussetzungen für die Aussagekraft der verschiedenen Methoden sind neben der Sensitivität die Spezifität der verwendeten Antikörper und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten. Ein Beispiel dieser Methoden stellt die immunhistochemische Färbung mittels **Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase (APAAP)** dar, die folgend näher beschrieben wird und in dieser Arbeit für die immunhistochemischen Untersuchungen Anwendung fand.

3.5.4 Antigennachweis mittels APAAP-Methode

Die immunhistochemische APAAP-Färbung der Kryostatschnitte beruht auf einer Technik, die 1984 durch Cordell et al. beschrieben wurde [92]. Wie oben erwähnt, stellt sie eine indirekte Methode dar, bei der das gesuchte Antigen durch den Einsatz eines unkonjugierten Primärantikörpers spezifisch erkannt, gebunden und im weiteren Verlauf über eine Antikörperkette farblich sichtbar wird. Ein zweiter Antikörper, sogenannter Sekundärantikörper, bindet an den Primärantikörper. Ein dritter Antikörper sollte wiederum an den zweiten binden und muss daher aus derselben Spezies stammen wie der Primärantikörper. Die Inkubation des Sekundärantikörpers muss dabei im Überschuss vorliegen, damit die Bindung mit dem einen Fab-Fragment an den Primärantikörper, mit dem anderen noch freien Fab-Fragment an den monoklonalen dritten Antikörper des löslichen Enzym-Immunkomplexes erfolgen kann (siehe Abbildung 11). Aufgrund dieser Brückenfunktion wird der Sekundärantikörper auch Brückenantikörper bezeichnet. Der Enzym-Immunkomplex, auch APAAP-Komplex genannt, besteht neben dem Antikörper (= anti alkalischer Phosphatase Antikörper) aus zwei Enzymen alkalische Phosphatase. Die nachfolgende Zugabe einer chromogenen Substratlösung hydrolisiert die alkalische Phosphatase mittels des Enzyms Naphtholphosphat zu Phenolen und Phosphaten und liefert mit farblosen Diazoniumsalzen unlösliche Azofarbstoffe. Die Verwendung von Neufuchsin-Entwicklerlösung erlaubt den immunhistochemischen Nachweis durch die intensive Rotfärbung des gesuchten Antigens.

Eine endogene alkalische Phosphatase-Aktivität, wie sie in einigen Leukozyten (z.B. Granulozyten) oder im Myoglobin der Muskelzellen auftritt, wird, laut Boenisch (2001), durch den Zusatz von Levamisole zur Färbungsreagenz supprimiert [93].

Als Vorteil dieser Methode erweist sich die Möglichkeit die Farbintensität durch die wiederholte Inkubation mit Sekundärantikörper und APAAP-Komplex zu steigern, indem eine vermehrte Anlagerung von Enzymen an die Antikörperkette erreicht wird [92] (siehe Abb.11).

Abb.11: APAAP-Antikörperkette

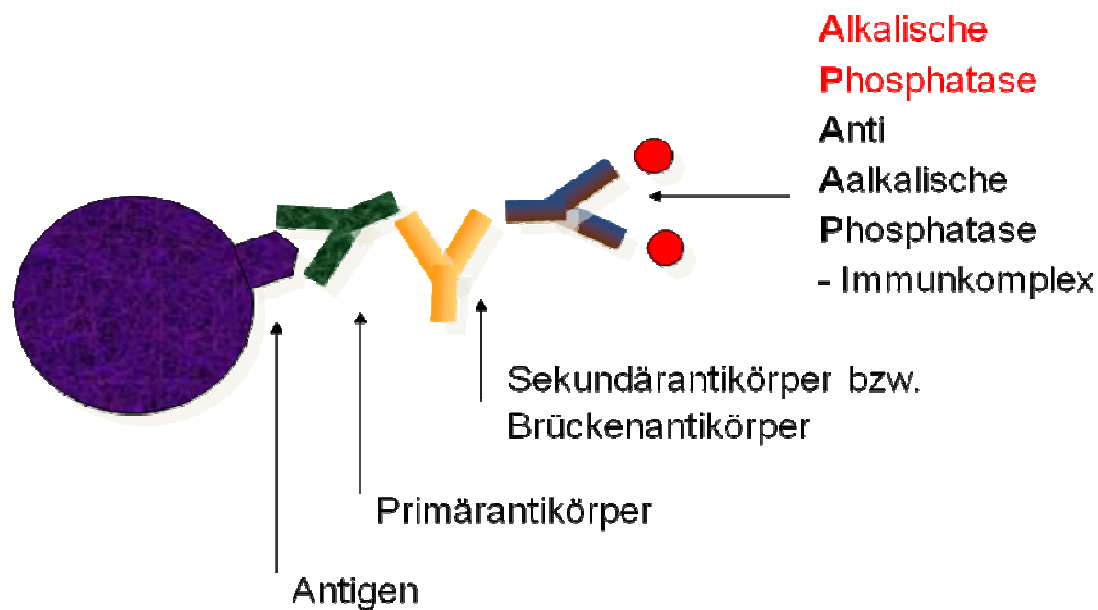


Abb.11 illustriert die APPAP-Methode. Der APAAP-Immunkomplex besteht aus zwei Enzymen alkalischer Phosphatase, die an einen anti-Alkalischer Phosphatase-Antikörper gebunden sind. Solche Enzym-Immunkomplex-Methoden gehören zu den empfindlichsten immunhistochemischen Nachweismethoden; sie nutzen die natürliche Affinität von Antikörper zu ihrem Antigen durch den Einsatz stabiler Immunkomplexe anstelle der relativ unsanften chemischen Konjugation. Sie zeigen eine bessere Sensitivität gegenüber anderen Methoden vorwiegend durch die größere Anzahl an Enzymmolekülen, die pro Gewebsantigen zur Verfügung stehen.

3.5.5 Gegenfärbung mit Häkalaun

Nach der spezifischen immunhistochemischen Färbung ist es sinnvoll, zur besseren Differenzierung des Gewebes, nicht spezifisch gefärbte Anteile des Gewebes gegen zu färben. So bot sich bei der roten Anfärbung der verwendeten APAAP-Methode die Verwendung von Häkalaun nach Meyer, ein Derivat von Haematoxylin, zur Gegenfärbung der Gewebeschnitte an. Insbesondere Zellkerne und Zytoplasma lassen sich mit der bläulichen Hintergrundfärbung vom übrigen Gewebe abgrenzen und erhöhen den Differenzierungsgrad der Gewebeschnitte.

3.5.6 Spezifität und Kontrolle

Unspezifische Färbungen können durch eine Reihe von Fehlern im Protokoll hervorgerufen werden (z.B. Fehlen der Substanz Levamisole bei der APAAP-Färbung, die die endogene Phosphatase-Reaktion unterdrückt – siehe oben).

Eine der häufigsten Ursachen ist jedoch die ungewollte Bindung von Antikörper an unspezifisches Gewebe im Präparatschnitt. Um die Spezifität der verwendeten Antikörper sicher zu stellen, müssen verschiedene Kontrollen durchgeführt werden.

Um eine mögliche, nicht gewollte Gewebefixierung durch das dem Primärantikörper folgende Nachweissystem (also Sekundär-, Tertiärantikörper) auszuschließen, sollten zur Kontrolle (auch Negativkontrolle genannt) die immunhistochemischen Untersuchungen ohne die Inkubation mit dem Primärantikörper durchgeführt werden.

Ohne den Primärantikörper sollte es zu keiner spezifischen Anfärbung kommen.

Die Kontrolluntersuchungen der in dieser Arbeit genutzten Färbungsmethoden zeigten ohne den Einsatz des Primärantikörpers keine Anfärbung.

Eine Positivkontrolle wurde stichprobenartig mit Gewebeproben durchgeführt, bei denen aus Vorversuchen ein hoher Antigenanteil bekannt war.

Für den Spezifitätsnachweis der polyklonalen Primärantikörper wurde der jeweilige Primärantikörper mit dem Zielantigen präabsorbiert. Durch die im Vorfeld überschüssige Zugabe des gesuchten Antigens wurde der Antikörper neutralisiert und sollte nun im Gewebeschnitt keine Möglichkeit zur Antigenkopplung aufweisen. Eine dennoch vermeintlich auftretende Anfärbung würde Anlass zur Vermutung einer unspezifischen Färbung geben.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper wurden die Spezifitätskontrollen durchgeführt. Es traten keine unspezifischen Färbungen auf.

Eine weitere Kontrolle stellt die sogenannte Isotypkontrolle dar, die an den monoklonalen Antikörper vollzogen wird. Anstelle eines spezifischen Antikörpers wird ein unspezifischer, gleicher Antikörper (z.B. IgG2a der Maus) eingesetzt, der ebenfalls keine spezifische Anfärbung im Gewebeschnitt hervorrufen sollte. Die durchgeführten Isotypkontrollen der in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper zeigten auch hier keine spezifischen Anfärbungen.

In der Literatur (Boenisch, 2001) [93] wird bei der APAAP-Methode die Vorinkubation mit Normalseren (= Blockersubstanz) empfohlen, wodurch potentiell auftretende unspezifische Bindungen (z.B. des Fc-Fragments von Monozyten) mit Primär- und

Sekundärantikörpern geblockt werden können. Der Einsatz von vorinkubiertem Rattenserum fand in der vorliegenden Arbeit ebenfalls Verwendung.

3.5.7 Antikörperverdünnung

Die Farbintensität bei der APAAP-Methode hängt unter anderem von der Konzentration des gewählten Primärantikörpers ab. Eine zu hoch gewählte Konzentration suggeriert dem Betrachter einen unverhältnismäßig großen Anteil exprimierter Antigene; umgekehrt einen zu niedrigen Anteil. Eine ausgewogene Verteilung der Farb-Intensitätsstufen gilt für die Beurteilung der Präparatschnitte als essentiell. Als Protokollvorlage dienten die Handbücher I und II „immunchemischer Färbemethode“ der Firma Dako (Boenisch 2001) [93], die Angaben der verschiedenen Antikörperhersteller, sowie die Vorgänger-Arbeit von S. Dietrich. Die von S. Dietrich etablierte Verdünnung der Primär- und Sekundärantikörper konnte in durchgeführten Verdünnungsreihen überwiegend bestätigt werden – sie stellten sich als die am günstigsten, mit für den Untersucher klar differenzierbaren Farb-Intensitätsstufen heraus. Lediglich die Sekundärantikörper für die Detektion von ICAM-1 wurden in einer Verdünnung von 1:200, für CD11B von 1:50 gewählt.

Folgende Antikörperkonzentrationen im jeweiligen Verdünnungsverhältnis

Antikörper : RPMI kamen in dieser Arbeit zur Anwendung:

Primärantikörper	Verdünnung	Hersteller
Mouse monoclonal anti-rat ICAM-1	1:100	Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan
Mouse monoclonal anti-rat OX-42 (CD11b)	1:20	BMA, Schweiz
Mouse monoclonal anti-rat ED1	1:50	Serotec, Oxford, UK
Goat polyclonal anti-human VCAM-1	1:20	Santa Cruz Biotechnology, USA

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Verdünnung	Firma
ICAM-1	Rabbit anti-Mouse IgG (H+L)	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland
CD11b	Rabbit anti-Mouse IgG (H+L)	1:50	Dianova, Hamburg, Deutschland
ED1	Rabbit anti-Mouse IgG (H+L)	1:50	Dianova, Hamburg, Deutschland
VCAM-1	Mouse anti-Goat IgG (H+L)	1:400	Dianova, Hamburg, Deutschland

Verbindungsantikörper	Rabbit anti-Mouse IgG (H+L)	1:300	Dianova, Hamburg, Deutschland
APAAP-Komplex	mouse monoclonal antibody	1:50	Dianova, Hamburg, Deutschland

3.5.8 Durchführung der APAAP Methode

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Gefrierschnitte bei Raumtemperatur aufgetaut. Um eine Kondensation und somit eine mögliche Beschädigung der Präparate zu verhindern, erfolgte das Auftauen in einer Plastikbox. Anschließend wurden die Schnitte in eis-kaltem 100% Aceton für eine Dauer von zehn Minuten fixiert, dann luftgetrocknet und nach weiteren zehn Minuten mit RPMI angefeuchtet.

Alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer, bei Raumtemperatur und mit einer Agensmenge von 100 µl durchgeführt.

Um eine unspezifische Bindung an Primär- und Sekundärantikörper zu vermeiden, wurden die Schnitte mit Rattenserum in einer Verdünnung 1:100 vorinkubiert.

Nach einmaligem Waschen mit Tris-Puffer erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in den für das Antigen entsprechend verdünnten Konzentrationen (siehe oben) für eine Dauer von 45 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils eine Minute mit Tris-Puffer gewaschen, danach mit dem Sekundärantikörper für eine Dauer zwischen 10-20 Minuten (je nach Antigen) inkubiert und schliesslich erneut gewaschen.

Für die Präparatschnitte, die mit dem polyklonalen Antikörper VCAM-1 versehen wurden, wurde hier ein weiterer Zwischenschritt mit einem Verbindungsantikörper notwendig.

Es folgte die 30 Minuten dauernde Inkubation mit dem APAAP-Komplex (siehe Abb.11) mit anschließender Spülung unter Leitungswasser. Um die Farbtintensität zu erhöhen wurden die Inkubationsschritte mit dem Sekundärantikörper und dem APPAP-Komplex jeweils für zehn Minuten wiederholt. Schließlich wurden die Schnitte in einem Schüttler in Neufuchsin-Entwicklungslösung für 30 Minuten bewegt, erneut gewaschen und mit Hämalun nach Meyer gegengefärbt. Da das rote Reaktionsprodukt der APPAP-Färbung weder Alkohol- noch Xylol-stabil ist, empfahl sich die Verwendung eines gelatinhaltigen Eindeckmittels. So wurden zur Konservierung als abschließenden Arbeitsschritt die Schnitte in Kaisers Glyceringelatine eingebettet und mit einem Deckgläschen versehen.

3.5.9 Auszählverfahren

Die Auswertung der gefärbten Schnitte fand am Lichtmikroskop (LEICA DMRB, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit einer 400-fachen Vergrößerung statt. Pro Herz wurden drei Schnitte ausgewertet sowie Kontrollfärbungen zum Ausschluss von unspezifischen, artifiziellen Farberscheinungen betrachtet.

Die Marker ICAM-1 und VCAM-1 wurden als Adhäsionsmoleküle auf Endothelien exprimiert. Zur Quantifizierung der Expression wurden 100 Venolen des Myokards anhand eines deskriptiven Färbegrades in einer Skala von 0-3 beurteilt.

Folgende Farbgrad-Einteilung wurde bei der Auswertung der ICAM-1 + VCAM-1 Schnitte verwendet:

<i>Keine Färbung</i>	-	<i>Grad 0</i>
<i>Geringe Färbung</i>	-	<i>Grad 1</i>
<i>Mäßige Färbung</i>	-	<i>Grad 2</i>
<i>Starke Färbung</i>	-	<i>Grad 3</i>

Nach der Bewertung der Präparatschnitte erfolgte die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

Die Beurteilung des Antigennachweises von ED1 und CD11-b erfolgte durch Auszählung positiv markierter angefärbter Leukozyten in zehn randomisierten

Gesichtsfeldern. Nach Auszählung wurden auch hier Mittelwert und Standardabweichung ermittelt.

Alle mikroskopischen Auszählungen erfolgten geblindet.

3.5.10 Material und Reagenzien der Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie kamen folgendes Material und Reagenzien zur Anwendung.

- Objektträger (Menzel Gläser, SuperFrost plus, Braunschweig, Deutschland)
- Deckgläser (Dr. Junghans Medical GmbH, Bad Lausick, Deutschland)

Verwendete Reagenzien:

- RPMI-Verdünnungsmedium
 - 50 ml RPMI
 - 450 ml Aqua bidestilliert
 - 50 ml inaktiviertes Rinderserum
 - 0,5 g Natriumazid
- TRIS-Puffer Zusammensetzung:
 - 9,0 g Tris-Base
 - 68,5 g Tris- HCL
 - 87,5 g NaCl
 - 10 l Aqua bidestilliert
- Aceton 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Rattenserum (Sigma, Jackson Immuno Research, USA)
- APPAP-Komplex = alkine phosphatase anti-alkaline phosphatase complex (mouse monoclonal antibody, Dianova, Hamburg, Deutschland)
- Hämaunlösung nach Mayer (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Glycergelatine (Darko Corporation, CA, USA)
- Neufuchsin Entwicklerlösung (Ansatz für 60ml) wurde wie folgt zusammengesetzt:

Lösungsansatz A

- Entwicklungs-Tris-Puffer 44,0 ml
 - 4,9 g Tris-Base
 - 1,5 g Tris HCL
 - 8,7 g NaCl

- 1 l Aqua bidestilliert
- mit 1 M HCL auf pH 8,7 einstellen
- AMPD – Levamisol – Lösung 15,5 ml
 - 25 mg Levamisol
 - 15,5 ml 0,2M 2-Amino-2-methyl-1,3 propanediol

Lösungsansatz B

- Naphtol-As-Bi-Phosphat 31 mg
- N,N-Dimethylformamid 375 µl

Lösungsansatz C

- 4%-ige Na-nitritlösung
 - 12,8 mg Na-nitrit 320 µl
 - 320 µl Aqua bidestilliert
- 5%-ige Neufuchsin-Stammlösung 125 µl
 - 5 g Neufuchsin
 - 100 ml 2 M HCL

Lösungsansatz A und C werden zuerst miteinander gemischt. Danach wird Lösung B hinzugegeben, der pH-Wert auf 8,7 titriert und eine Reaktionszeit von 2 Minuten angesetzt. Abschließend wird die Entwicklerlösung filtriert.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Instituts für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität in Gießen. Dabei wurden zweifaktorielle Varianzanalysen mit der Auswertungssoftware SPSS für Windows Version 15.0 verwendet. Die Daten wurden im Rahmen der deskriptiven Statistik als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (Median, Spannweite) angegeben. Wechselwirkungen zwischen dem Sepsisauslöser LPS und den Medikamenten c3ado bzw. Neplanocin konnten über die Berechnung der Konfidenzintervalle bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse beurteilt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Übersicht

184 Ratten wurden mit dem Sepsiserreger *Escherichia Coli* (LPS) und den Pharmaka 3-Deazaadenosin (c3ado) sowie Neplanocin in mehreren Konditionen prämediziert. Anhand verschieden definierter Medikamenten-Dosierungen wurde die kardioprotektive Wirkung von c3ado an LPS-induzierten septischen Rattenherzen in einer Dosis-Wirkungsbeziehung untersucht. Die Behandlung der Ratten mit Neplanocin, einem Inhibitor der Methylierungsreaktion, wurde in zwei unterschiedlichen Konzentrationen mit der Intention durchgeführt, einen potentiellen Erklärungsansatz für den bisher unbekannten Wirkungsmechanismus von c3ado zu finden. Mit Hilfe der zellfrei isolierten Perfusion der Rattenherzen sowie der immunhistochemischen Aufarbeitung wurde der Einfluss der beiden Medikamente, c3ado und Neplanocin, auf die Herzfunktion, das Blutbild und die mediatorinduzierten histologischen Gewebeveränderungen analysiert. Von besonderem Interesse bei der Perfusion der Rattenherzen waren die physiologischen Parameter der Kontraktilität (LVDP und dP/dt_{max}) sowie der koronaren Durchblutung (CPP). Hauptaugenmerk bei der Auswertung der Blutwerte wurde auf die Zellverteilung im großen und differenzierten Blutbild gelegt, während sich die immunhistochemische Untersuchung auf die dosisabhängige Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und der Leukozytenaktivierung über CD11b und ED1 konzentrierte.

4.2 Ergebnisse der Blutwertbestimmung

Nach der achtstündigen Prämedikationsphase wurde den Versuchstieren venöses, heparinisiertes Blut aus der Vena cava inferior entnommen und ein Blutbild bestimmt. Als Referenzwerte dienten die vom Rattenlieferanten, Charles River, zur Verfügung gestellten Blutwerte, die in der folgenden Tabelle dargestellt werden.

	Mittelwert	Range \pm 2x SD	Einheit
Hämatokrit	36	32 – 40	%
Hämoglobin	13.5	12.2 – 14.8	mg/dl
Erythrozyten	6.46	5.79 – 7.14	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Leukozyten	8660	5100-12160	$/\mu\text{l}$
<i>Lymphozyten</i>	85	76-98	%
<i>Eosinophile</i>	1	0 – 3	%
<i>Basophile</i>	0	0 – 2	%
<i>Monozyten</i>	0	0 – 2	%
<i>Segmentkernige</i>	12	2 – 12	%
<i>Stabkernige</i>	0	0-2	$\times 10^3/\mu\text{l}$
Thrombozyten	k.A.	k.A.	$\times 10^3/\mu\text{l}$

Tab. 1: Hämatologische Referenzwerte männlicher Wistar-Ratten (Alter von 6-8 Wochen) mit entsprechendem Körpergewicht von etwa 250 g [Quelle: Charles River Laboratories Technical Bulletin: Baseline Hematology and Clinical Chemistry Values for Charles River Wistar Rats CRL:(WI)BR as a Function of Sex and Age]. Bezüglich der Thrombozyten und Stabkernigen gibt es keine genauen Angaben.

Anhand der angegebenen physiologischen Referenzwerte wird deutlich, dass die weißen Blutkörperchen der Ratten vornehmlich von einem lymphoiden Differentialblutbild geprägt sind. Mit einem Mittelwert um 85% hebt sich der Anteil der Lymphozyten deutlich von den anderen Blutbestandteilen der Leukozyten ab. Der weitaus geringere prozentuale Anteil der Granulozyten zeigt in der weiteren Differenzierung das überwiegende Auftreten von segmentkernigen Granulozyten.

Die ermittelten Blutwerte der Kontrollgruppe (Gruppe1) lagen im Bereich der von Charles River angegebenen Referenzwerte. Die ermittelten Mittelwerte der Blutergebnisse von $n = 12$ Tiere pro Versuchsgruppe werden in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Blutwert \ Mittelwert (n = 12)	Kontroll-Gruppe (Gruppe 1)	LPS-Gruppe (Gruppe 2)
Hämatokrit (/µl)	41,4	42,5
Hämoglobin (mg/dl)	14,1	14,2
Erythrozyten (x 10 ³ /µl)	7,033	7,098
Leukozyten (/µl)	8630	7920
<i>Lymphozyten</i> (%)	90,2	21,6 *
<i>Eosinophile</i> (%)	0,4	0,4
<i>Monozyten</i> (%)	3,6	0,8
<i>Segmentkernige</i> (%)	5,1	40,3 *
<i>Stabkernige</i> (%)	0,8	36,5 *
Thrombozyten (x 10 ³ /µl)	1048,9	536,6 *
LDH	83	169 *

Blutwert \ Mittelwert (n = 12)	LPS + c3Ado100µg (Gruppe 3)	LPS + c3Ado1mg (Gruppe 4)	LPS + c3Ado5mg (Gruppe 5)	LPS + c3Ado10mg (Gruppe 6)
Hämatokrit (/µl)	41,1	40,7	41,4	40,1
Hämoglobin (mg/dl)	14,6	14,4	14,9	14,1
Erythrozyten (x 10 ³ /µl)	7,181	7,038	7,227	6,655
Leukozyten (/µl)	6742	5375	7800	5891
<i>Lymphozyten</i> (%)	24,9 *	31,4 *	58,6 * ++	92,2 ++
<i>Eosinophile</i> (%)	0,3	0,7	0,5	0
<i>Monozyten</i> (%)	2,3	2,0	1,5	0,7
<i>Segmentkernige</i> (%)	42,2 *	31,2 *	21,2 * ++	6,1 ++
<i>Stabkernige</i> (%)	30,3 *	34,5 *	18,6 ++ *	1,2 ++
Thrombozyten (x 10 ³ /µl)	566,4 *	538 *	732,4	1057,1 ++
LDH	145	375 *	1169 * ++	1718 * ++

* signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe (p < 0,05)

Blutwert \ Mittelwert (n = 12)	c3Ado100µg (Gruppe 7)	c3Ado1mg (Gruppe 8)	c3Ado5mg (Gruppe 9)	c3Ado10mg (Gruppe 10)
Hämatokrit (/µl)	39,4	38,1	40,8	40,1
Hämoglobin (mg/dl)	14,1	14,0	14,0	14,9
Erythrozyten (x 10 ³ /µl)	7,182	7155	6,796	6,074
Leukozyten (/µl)	7175	7375	6925	6483
<i>Lymphozyten</i> (%)	67,5 ++	64,8 ++	55,3 ++ *	59,8 +++
<i>Eosinophile</i> (%)	0,4	0,6	0,7	0,9
<i>Monozyten</i> (%)	4,8	3,5	5,7	3,9
<i>Segmentkernige</i> (%)	22,7 ++ *	27,4 ++	26,3 ++ *	27,9 +++
<i>Stabkernige</i> (%)	4,4 ++ *	3,8 ++ *	12,1 ++ *	7,6 ++ *
Thrombozyten (x10 ³ /µl)	1055,9	1086,4	1001	1084,7
LDH	129	181 *	333 *	423 *

<u>Blutwert \ Mittelwert</u> (n = 12)	Neplanocin 1mg (Gruppe 11)	Neplanocin 10mg (Gruppe 12)	LPS + Neplanocin1mg (Gruppe 13)	LPS + Neplanocin10mg (Gruppe 14)
Hämatokrit (/µl)	40,6	40,0	41,2	39,6
Hämoglobin (mg/dl)	14,5	13,7	14,3	13,6
Erythrozyten (x10 ³ /µl)	7,142	6,696	7,0667	6,859
Leukozyten (/µl)	10433	9092	10292	5455
<i>Lymphozyten</i> (%)	45,3 ++ *	40,6 *	29,9 *	24,3 *
<i>Eosinophile</i> (%)	0,5	0,3	0,4	0
<i>Monozyten</i> (%)	3,8	3,7	2,5	0,75
<i>Segmentkernige</i> (%)	41,9 *	43,8 *	35,8 *	38,4 *
<i>Stabkernige</i> (%)	8,2 ++ *	11,2 ++ *	31,4	36,2 *
Thrombozyten (x10 ³ /µl)	1059,7	987,6	689,3 *	596,0 *
LDH	85	93	157 *	169 *

Tab. 2: Blutbild- und LDH-Ergebnisse der Gruppen 1 bis 14 .

* signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe (p < 0,05)

Während die Blutwerte Hämatokrit, Hämoglobin und Erythrozyten in allen Versuchsgruppen im Referenzbereich der Normalwerte liegen, werden Unterschiede bei den Thrombozyten-, LDH-Werten und im Differentialblutbild erkennbar.

Unter LPS (Gruppe 2) reduziert sich die Thrombozytenzahl auf knapp die Hälfte ($583,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ vs. $1002,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ Kontrollgruppe), während mit zunehmender c3ado-Konzentration die Thrombozytenzahl wieder ansteigt und schließlich bei höchster c3ado-Konzentration (Gruppe 6) Normalniveau erreicht. Ohne Effekt bleibt die Kombination mit Neplanocin. Auch die Monotherapien mit c3ado sowie Neplanocin erweisen sich ohne Einfluss auf die Thrombozytenzahl.

Bei der Betrachtung des LDH-Wertes lässt sich unter LPS-Gabe (Gruppe 2) ein Wertanstieg (158 vs. 82 U/l Kontrollgruppe) feststellen. Gleiches gilt für die Kombination von LPS mit c3ado unter deren Einfluss der LDH-Wert mit zunehmender c3ado-Dosierung deutlich bis auf einen Maximalwert von 1587 U/l in Gruppe 6 (höchste c3ado-Konzentration von 10mg/kg) ansteigt. Auch unter Monotherapie mit c3ado lässt sich ein moderater LDH-Anstieg verzeichnen. Auffallend bleibt hier zu vermerken, dass die LDH-Werte der c3ado Monotherapie-Gruppen dennoch höher ausfallen, als in der LPS-Gruppe: Monotherapie-c3ado (Gruppe 10): LDH 406 U/l gegenüber LPS (Gruppe 2): LDH 158 U/l.

In der Kombination LPS + Neplanocin bewegen sich die LDH-Werte auf LPS-Niveau (Gruppe 14: LDH 184 U/l). Keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe sind hingegen bei den Tieren zu beobachten, die lediglich mit Neplanocin behandelt wurden, (Gruppe 11: LDH 84 U/l und Gruppe 12: LDH 95 U/l).

Eine markante Wertverschiebung lässt sich beim Vergleich des Differentialblutbildes feststellen, wenngleich der Absolutwert der Leukozyten bei den Versuchsgruppen konstant im Normalbereich liegt. Hier zeigt sich bei allen LPS-behandelten Versuchsgruppen eine deutliche Linksverschiebung der Blutwerte mit Zunahme der Segment- und Stabkernigen Granulozyten und Abnahme der Lymphozyten. Im Vergleich zwischen Kontroll- und LPS-Gruppe sinkt der prozentuale Wert der Lymphozyten in der LPS-Gruppe auf unter ein Viertel (90,2% vs. 21,6%), während die Werte für Segmentkernige von 5,8% auf 40,8% und für Stabkernige Granulozyten von 1% auf 34,3% steigen. Unter zunehmender c3ado-Medikation bilden sich die Blutwerte stetig zurück und haben sich in Gruppe 6 (Lymphozyten 91,8%; Segmentkernige 6,8%; Stabkernige 1%) bei maximaler c3ado-Dosierung normalisiert.

Interessanterweise lässt sich eine Veränderung des Differentialblutbildes ebenso bei der Monotherapie mit c3ado (Gruppen 7-10) erkennen. Auch hier tritt eine Linksverschiebung ein mit moderater Wertveränderung. Gleiches gilt für die

Monotherapie mit Neplanocin (Gruppen 11+12), während die Werte bei der Gabe von LPS und Neplanocin (Gruppen 13+14) denen der LPS-Gruppe gleichen.

4.3 Ergebnisse der Perfusion

4.3.1 Linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP)

Der linksventrikulär entwickelte Druck entspricht der Differenz von linksventrikulär-endsystolischem und -enddiastolischem Druck. Er wurde während der Perfusionsdauer zu vier Zeitpunkten gemessen: Nach 15 Minuten ($t = 15 \text{ min}$), 30 ($t = 30 \text{ min}$), 45 ($t = 45 \text{ min}$) und 60 Minuten ($t = 60 \text{ min}$).

Die ermittelten Werte werden als Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils sechs perfundierten Rattenherzen ($n = 6$) einer Versuchsgruppe angegeben.

Nach dem Beginn der Druckaufzeichnung und einer 15 Minuten dauernden Equilibrierungsphase wurden die ersten Messwerte bestimmt (Zeitpunkt $t=15\text{min}$). Sie dienten als Referenzwerte für die Erhebung der folgenden Werte. In der LPS-Gruppe zeigt sich bereits hier im Vergleich zur Kontrollgruppe (LVDP = $102,1 \pm 5,3 \text{ mmHg}$) ein signifikant ($p < 0,05$) reduzierter Mittelwert des LVDP von $39,8 \pm 4,5 \text{ mmHg}$.

Interessant stellt sich die Wertentwicklung in den Gruppen 3-6 (LPS+c3ado) dar. Ausgehend von einem Mittelwert bei knapp über LPS-Niveau von $46,6 \pm 4,6 \text{ mmHg}$ (Gruppe 3) wird mit zunehmender c3ado-Konzentration eine aufsteigende Tendenz bis unmittelbar unter Kontrollgruppen-Niveau (Gruppe 6: $94,1 \pm 6,0 \text{ mmHg}$) erkennbar. In der Gruppe 6 mit der höchsten c3ado-Dosierung von 10mg/kg KG zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mehr. Die Werte der c3ado-Mono-Therapiegruppen (Gruppen 7-12) gleichen dem der Kontrollgruppe, während die Gruppen unter LPS+Neplanocin (Gruppen 13+14) ähnliche Mittelwerte wie die LPS-Gruppe aufweisen und sich damit signifikant ($p < 0,05$) von der Kontrollgruppe abheben.

Die Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen 12 bis 15 graphisch dargestellt.

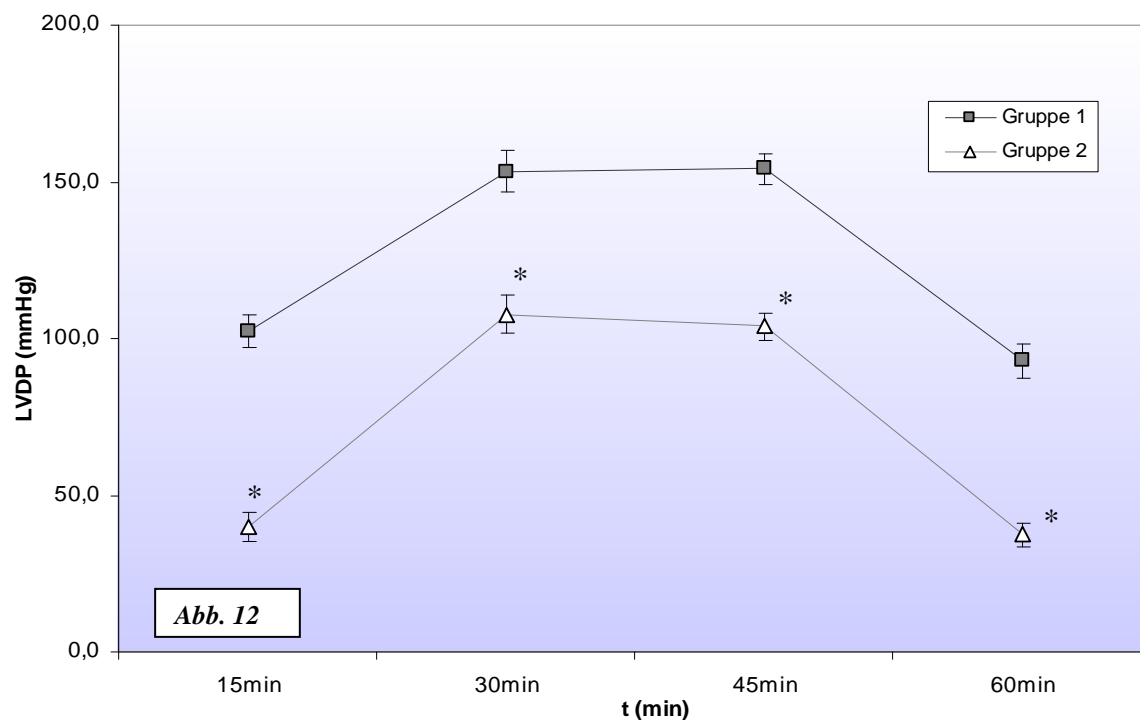


Abb. 12: Veränderung des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) (Mittelwert $n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in der Kontroll- und LPS-Gruppe. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$).

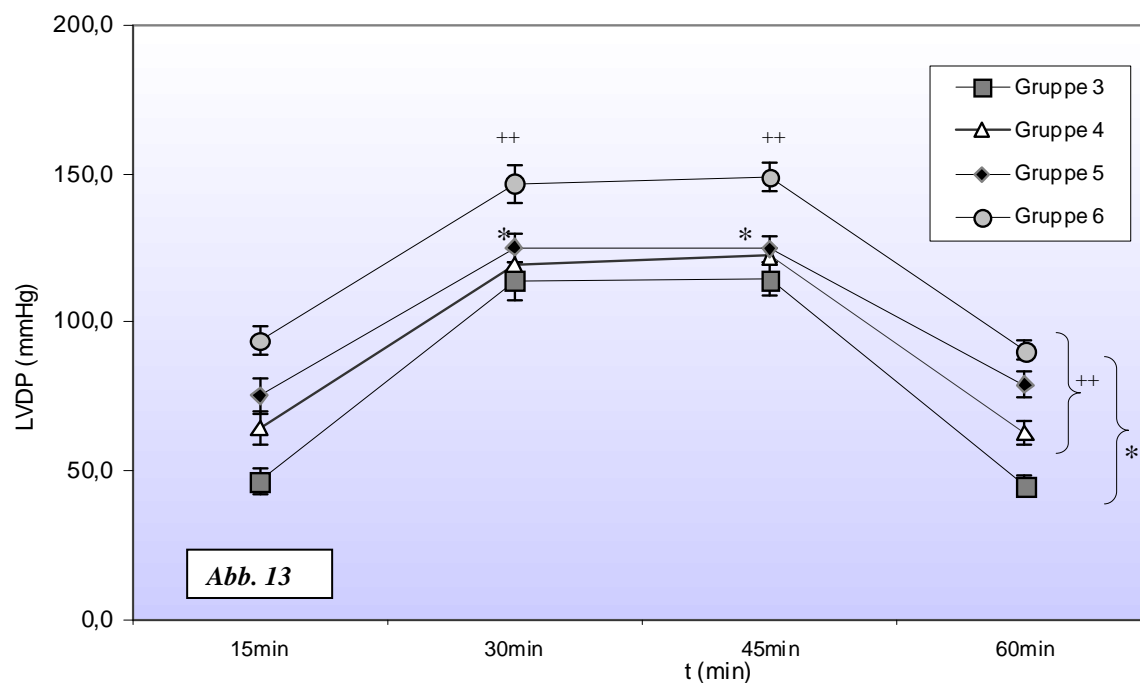


Abb. 13: Veränderung des LVDP-Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den LPS+c3ado-Gruppen 3-6. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$) ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$)

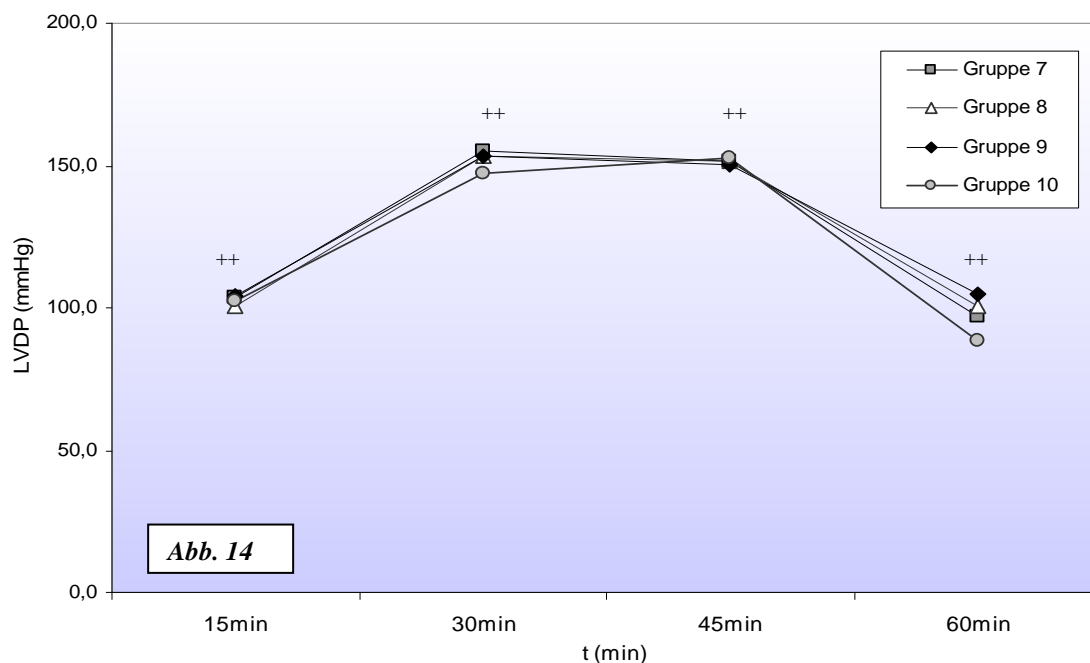


Abb. 14: Veränderung des LVDP-Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den c3ado-Monotherapie-Gruppen 7-10. Die Standardabweichung wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet – sie betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 3,3$ und $6,2$ mmHg. Kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$)

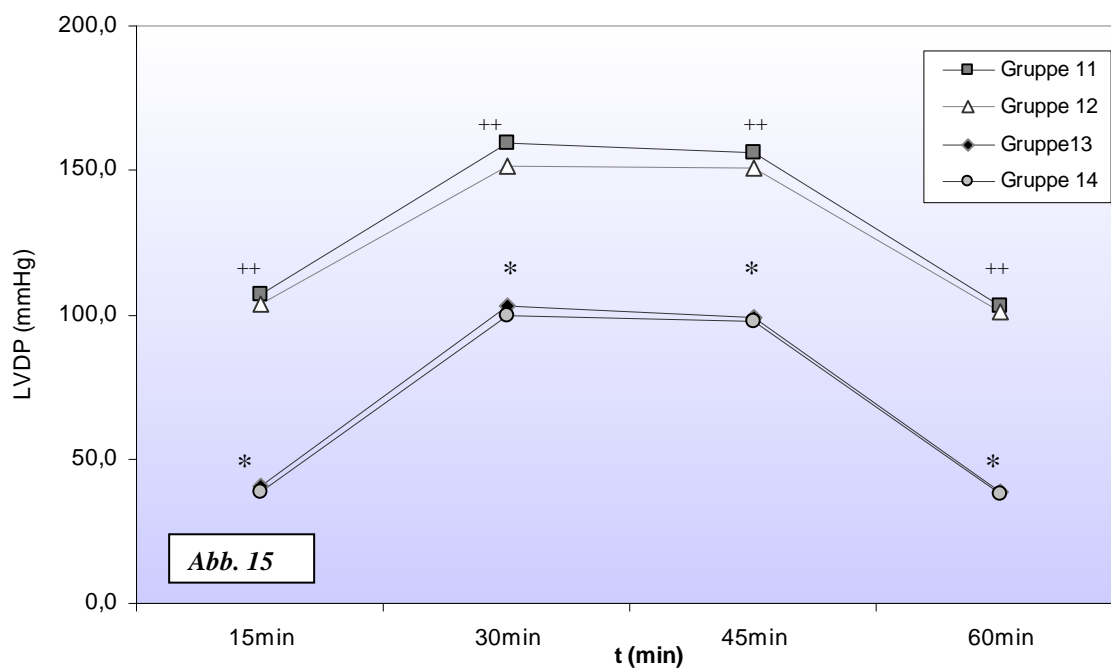


Abb. 15: Veränderung des LVDP-Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den Neplanocin-Monotherapie-Gruppen 11+12 sowie

*LPS+Neplanocin- Gruppen 13+14. Die Standardabweichung wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet – sie betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 2,0$ und $6,5$ mmHg. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$) ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).*

Unmittelbar nach der ersten Messwertbestimmung erfolgte die kardiale Stimulation mittels Beimischung von Adrenalin zum zirkulierenden Perfusat für die Dauer von einer halben Stunde. Während dieser Zeit wurde jeweils zu den Zeitpunkten $t = 30$ min und $t = 45$ min der 2. bzw. 3. Messwert registriert.

Bei der Kontrollgruppe lässt sich bei $t = 30$ min ein Anstieg des LVDP-Mittelwertes um knapp 50 % auf $153,4 \pm 6,5$ mmHg feststellen. Dieser Wert bleibt bei $t = 40$ min mit $154,2 \pm 4,9$ mmHg nahezu stabil (Abb.12)

Steigende Mittelwerte finden sich ebenso bei der LPS-Gruppe, jedoch bleiben die Mittelwerte mit $107,6 \pm 6,1$ mmHg bzw. $103,9 \pm 4,3$ mmHg erneut signifikant ($p < 0,05$) unter denen der Kontrollgruppe. Gleiches gilt wiederum für die Messwerte bei der Kombinationstherapie LPS+Neplanocin (Gruppen 13+14), wie in Abb.15 erkennbar.

In den Gruppen 3-6 bestätigt sich die aufsteigende Tendenz der Mittelwerte mit zunehmender c3ado-Konzentration (Abb.13), während sich die Mittelwerte der Therapiegruppen mit c3ado sowie Neplanocin auf Kontrollniveau bewegen (Abb.14+15).

Der Stimulationsphase folgt eine weitere Messwertbestimmung zum Zeitpunkt $t=60$ min. Dabei ergibt der Gruppenvergleich ein ähnliches Bild wie zum Zeitpunkt $t=15$ min. Die LPS-Gruppe liegt mit $37,3 \pm 3,6$ mmHg signifikant ($p < 0,05$) unter der Kontrollgruppe mit $92,8 \pm 5,7$ mmHg (Abb.12). Auffallend ist die Wertentwicklung der Behandlungsgruppe LPS mit höchster c3Ado-Konzentration (Gruppe 6), die mit einem Mittelwert von $90,6 \pm 4,6$ mmHg einen vergleichbar hohen Wert mit der Kontrollgruppe erreicht (Abb.13).

4.3.2 Kontraktilitätsparameter (dP/dt_{\max})

Die Registrierung des Parameters (dP/dt_{\max}) an den isolierten zellfrei perfundierten Herzen gibt die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel wieder und erlaubt, neben dem LVDP, die Beurteilung der Myokardkontraktilität. Die zu den bereits

bekannten Zeitpunkten ermittelten Messwerte werden ebenfalls als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Beim ersten Blick ergibt sich im Vergleich zum LVDP ein ähnliches Erscheinungsbild.

Nach den 15 Minuten der Equilibrierungsphase wird bei der ersten Messwertbestimmung auch hier eine deutliche signifikante ($p < 0,05$) Diskrepanz zwischen der Kontroll- ($3425 \pm 163,3 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$) und der LPS-Gruppe ($1020 \pm 131,3 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$) erkennbar. Die mit LPS + c3ado behandelten Gruppen (Gruppen 3-6) zeigen erneut steigende Messwerte mit zunehmender c3ado-Konzentration (Maximalwert in Gruppe 6: $2945 \pm 204,3 \text{ mmHg} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Messwerte der Monotherapie-Gruppen 7-12 (c3ado sowie Neplanocin) gleichen denen der Normalgruppe, während die LPS+Neplanocin- Herzen (Gruppen 13+14) eine mit den LPS-Herzen vergleichbar erniedrigte Kontraktilität aufweisen.

Die Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen 16 bis 19 graphisch dargestellt.

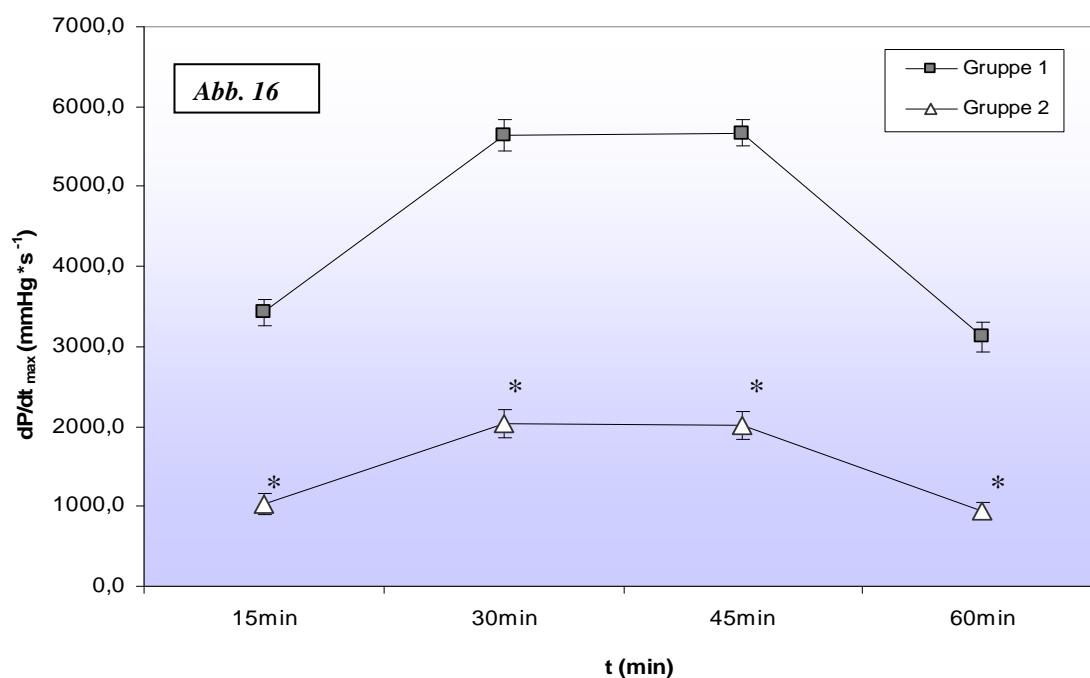


Abb. 16: Veränderung des dP/dt_{\max} -Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in der Kontroll- und LPS-Gruppe. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$).

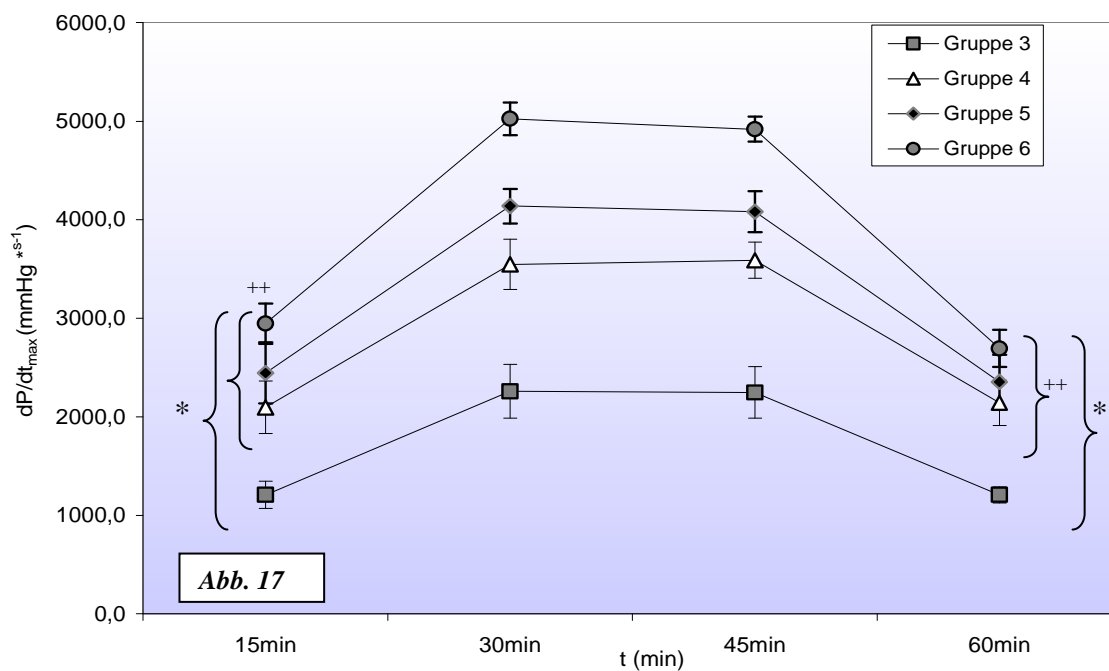


Abb. 17: Veränderung des dP/dt_{max} -Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den LPS+c3ado-Gruppen 3-6. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$). ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

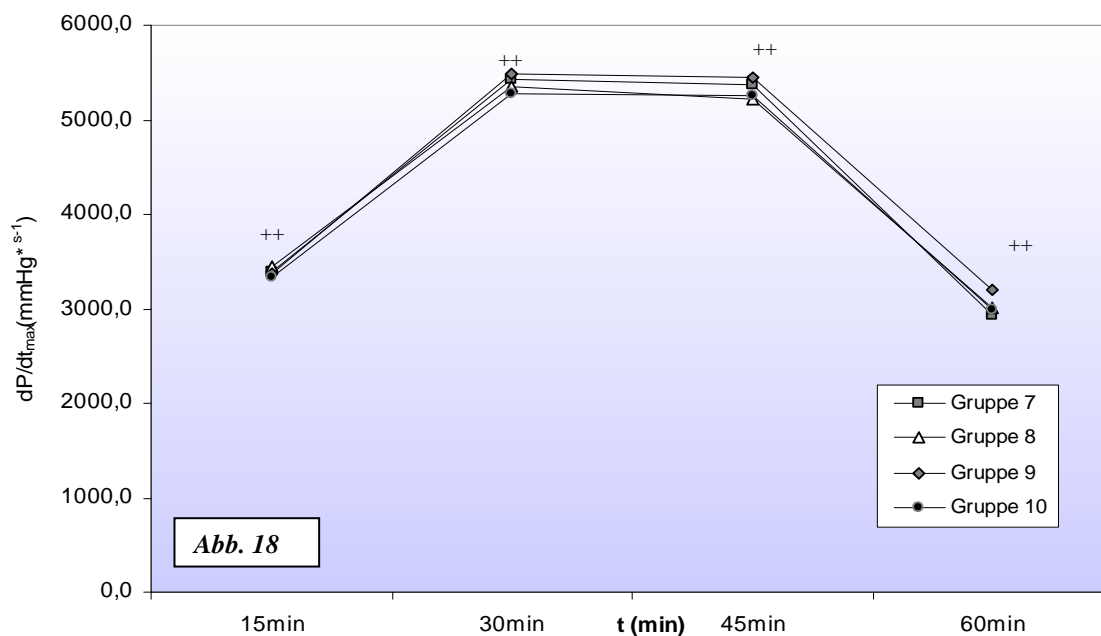


Abb. 18: Veränderung des dP/dt_{max} -Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den c3ado-Gruppen 7-10. Die Standardabweichung wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet – sie betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 97,2$ und $237,0 \text{ mmHg*s}^{-1}$. kein signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe. ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

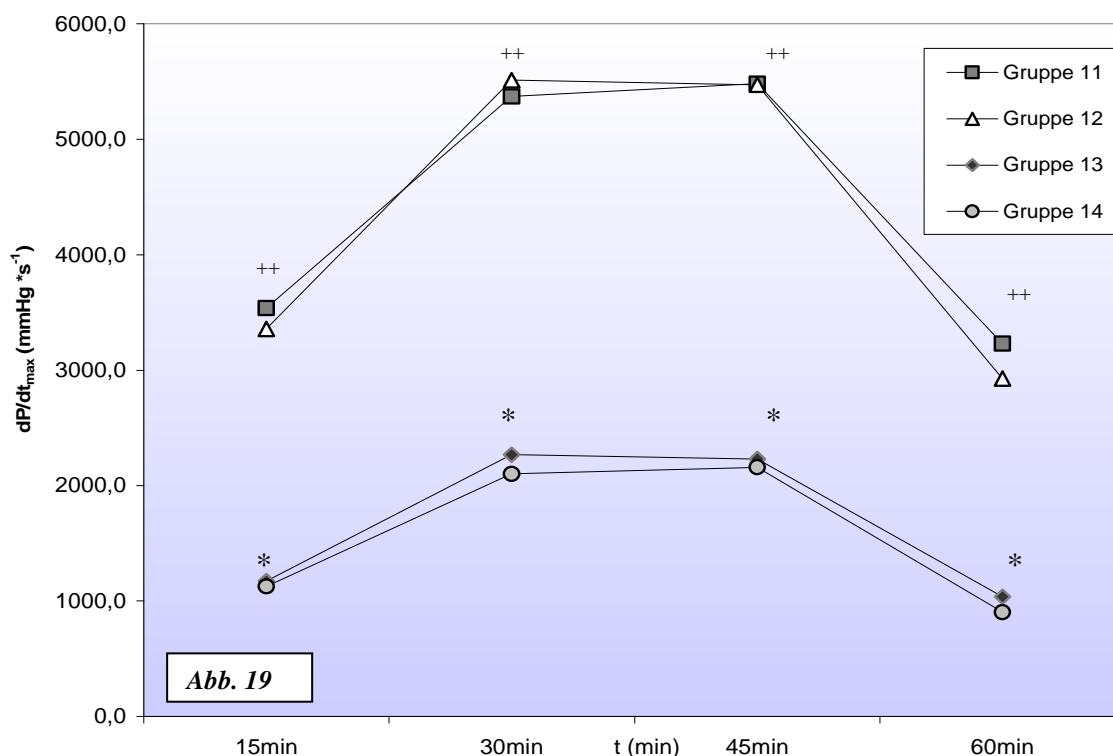


Abb. 19: Veränderung des dP/dt_{\max} -Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den Neplanocin-Monotherapie-Gruppen 11+12 sowie LPS+Neplanocin-Gruppen 13+14. Die Standardabweichung wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet – sie betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 72,8$ und $304,7 \text{ mmHg*s}^{-1}$. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$). ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

Die Diskrepanz der Mittelwerte im Gruppenvergleich bleibt unter Katecholamin-Stimulation zu den Zeitpunkten $t = 30 \text{ min}$ bzw. $t = 45 \text{ min}$ erhalten. Die Kontraktilität der Herzen in den LPS- und LPS+Neplanocin-Gruppen steigt zwar unter Katecholamin an, liegt aber mit $2041,7 \pm 174,7 \text{ mmHg*s}^{-1}$ bzw. $2008,3 \pm 168,6 \text{ mmHg*s}^{-1}$ (LPS-Gruppe) signifikant ($p < 0,05$) unter dem Wert der Kontrollgruppe ($5643,3 \pm 197,3 \text{ mmHg*s}^{-1}$ bzw. $5675,0 \pm 158,3 \text{ mmHg*s}^{-1}$). Die Messwerte der Monotherapie-Gruppen 7-12 bleiben wie schon zuvor auf dem Niveau der Kontrollgruppe, während in der Kombination LPS + c3ado sich erneut steigende Kontraktilitätswerte mit zunehmender c3ado-Konzentration feststellen lassen. Der dP/dt_{\max} -Mittelwert nahm hier signifikant ($p < 0,05$) von $2258,3 \pm 273,5 \text{ mmHg*s}^{-1}$ bzw. $2246,7 \pm 260,0 \text{ mmHg*s}^{-1}$ in Gruppe 3 ($100\mu\text{g c3ado}$) auf $5025,0 \pm 166,0 \text{ mmHg*s}^{-1}$ bzw. $4918,3 \pm 125,8 \text{ mmHg*s}^{-1}$ in Gruppe 6 (10mg c3ado) zu.

Wie in den vorangegangenen Abbildungen ersichtlich, sinken die Messwerte nach der adrenergen Stimulationsphase zum Zeitpunkt $t = 60$ min auf Ausgangsniveau. Die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) bei der Kontraktilitätsbestimmung der Versuchsgruppen bleiben bestehen.

4.3.3 Koronarer Perfusionsdruck

Die Registrierung des koronaren Perfusionsdruckes wurde durch eine Ableitung im Bereich der Aortenkanüle zum computergesteuerten Messsystem erfasst. Mithilfe eines Brückenverstärkers wurden die Druckwerte amplifiziert und auf dem Bildschirm des PC sichtbar. Im Vergleich zum LVDP und dP/dt_{\max} zeigte sich hier zu den bekannten Zeitpunkten ein verändertes Verlaufsdiagramm der Mittelwerte.

Bei der ersten Druckmessung zum Zeitpunkt $t = 15$ min liegen die ermittelten Mittelwerte aller Versuchsgruppen dicht beieinander. Die Kontrollgruppe weist einen Perfusionsdruck von $45,0 \pm 3,5$ mmHg auf, die LPS-Gruppe $41,2 \pm 6,8$ mmHg, die Werte der übrigen Versuchsgruppen liegen zwischen 40,2 und 46,0 mmHg. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen 20 bis 23 graphisch dargestellt.

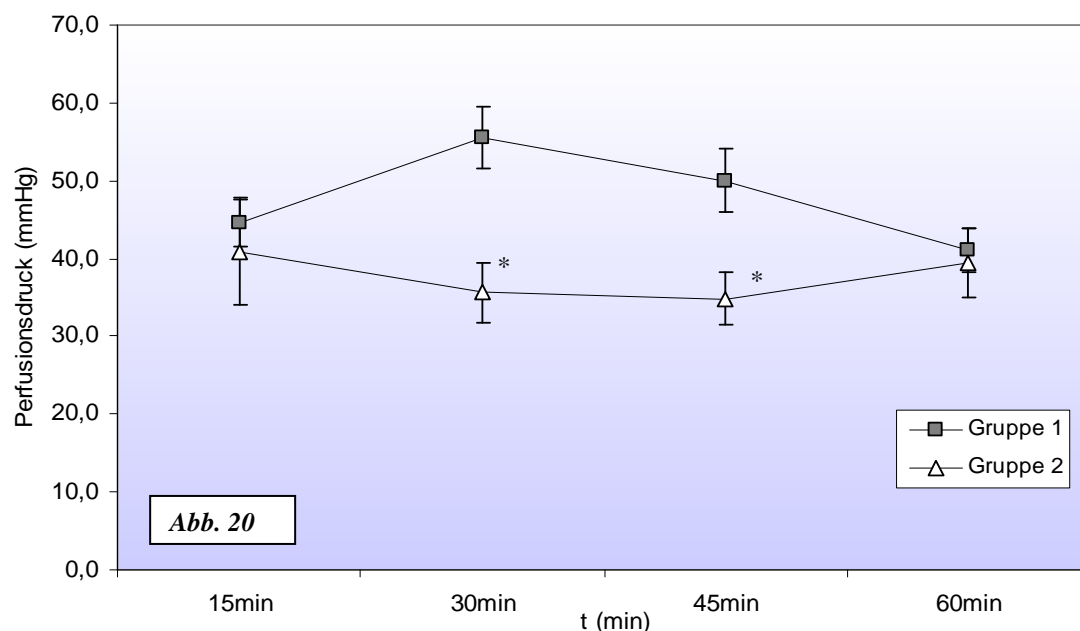


Abb. 20: Veränderung des Perfusionsdruck-Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in der Kontroll- und LPS-Gruppe. Die Standardabweichung betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 2,8$ und $6,8$ mmHg. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$).

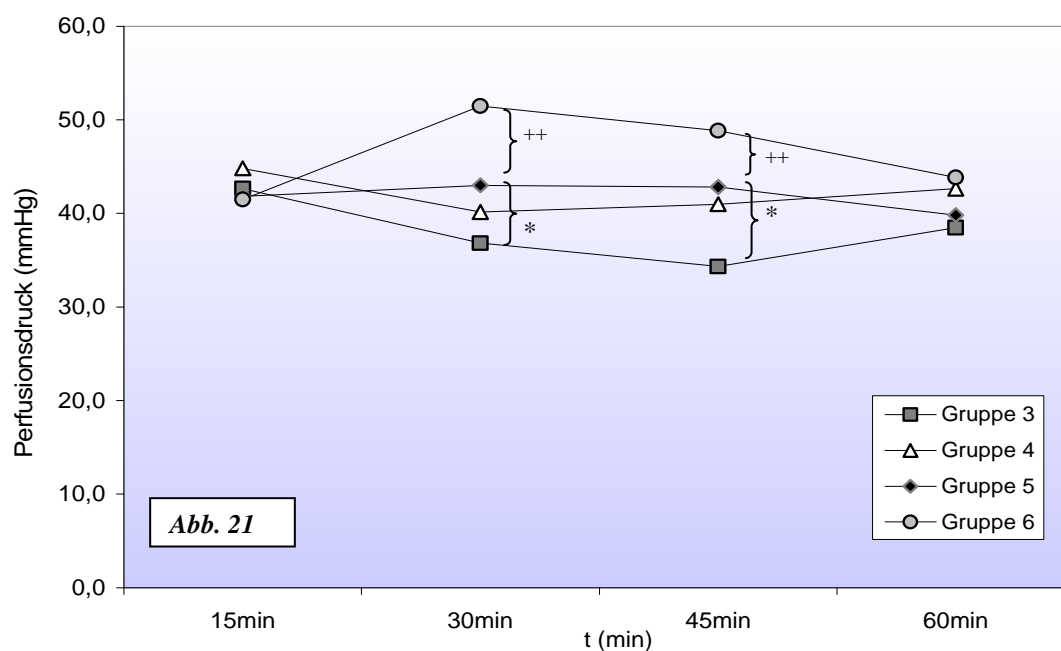


Abb. 21: Veränderung des Perfusionsdruck-Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den LPS+c3ado-Gruppen 3-6. Die Standardabweichung wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet – sie betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 2,6$ und $5,3$ mmHg. ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

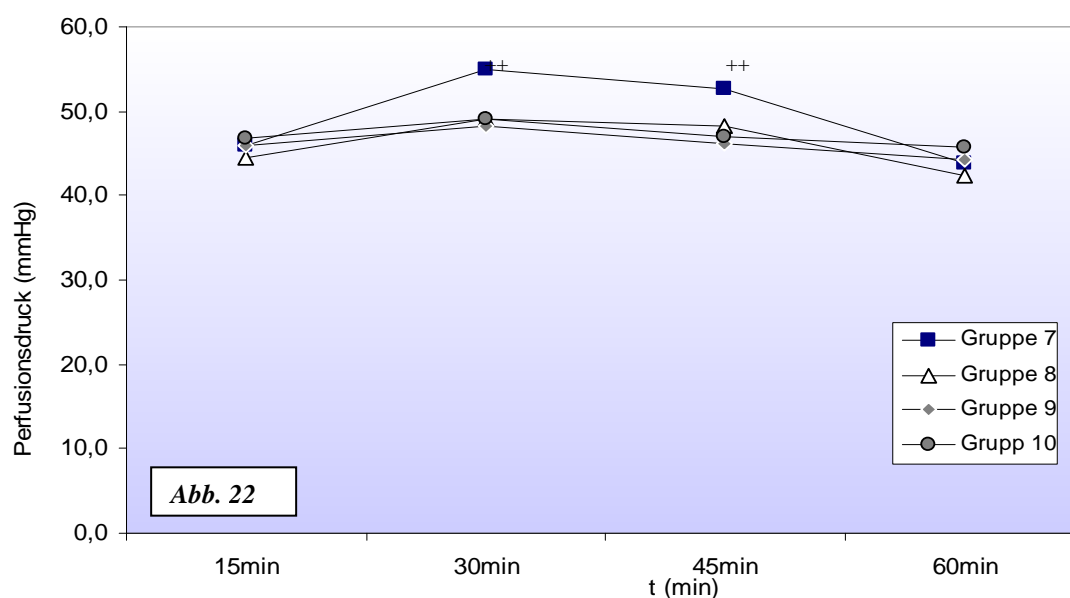


Abb. 22: Veränderung des Perfusionsdruck-Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den c3ado-Gruppen 7-10. Die Standardabweichung wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet – sie betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 2,6$ und $4,9$ mmHg. ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

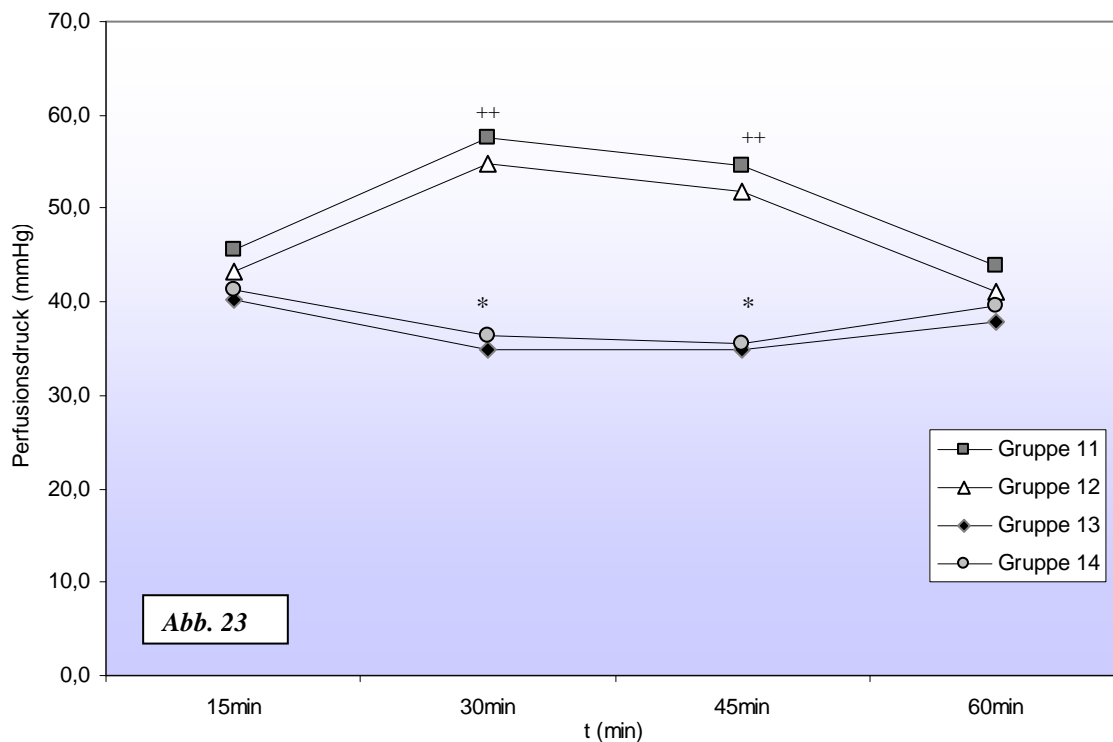


Abb. 23: Veränderung des Perfusionsdruck-Mittelwertes ($n = 6$) vor, während und nach der Katecholaminstimulation in den Neplanocin-Monotherapie-Gruppen 11+12 sowie LPS+Neplanocin- Gruppen 13+14. Die Standardabweichung wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht eingezeichnet – sie betrug bei den ermittelten Werten zwischen $\pm 1,5$ und $5,3$ mmHg. ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

Mit der koronaren Einschwemmung von Katecholaminen weitet sich die Spannbreite der ermittelten Werte. Während der halbstündigen Stimulationsphase steigt der Perfusionsdruck der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt $t = 30$ min bzw. $t = 45$ min auf $55,5 \pm 4,0$ mmHg bzw. $50,0 \pm 4,1$ mmHg. Der Mittelwert der LPS-Gruppe sinkt hingegen leicht und liegt mit $35,7 \pm 3,8$ mmHg bzw. $34,8 \pm 3,4$ mmHg signifikant unter dem Perfusionsdruck der Kontrollgruppe. Einen weiteren signifikanten Druckunterschied lässt sich beim Vergleich der LPS- + c3ado-Gruppen 3-6 erkennen. Unter dem Einfluss der maximalen c3ado-Konzentration von 10mg/kg KG (Gruppe 6) zeigt sich ein ähnlicher Druckverlauf wie bei der Kontrollgruppe. Mit einem Mittelwert von $51,5 \pm 4,6$ mmHg bzw. $48,8 \pm 3,2$ mmHg liegt der Perfusionsdruck signifikant ($p < 0,05$) höher als bei den Herzen der Gruppe 3, die mit der niedrigsten c3ado-Konzentration von 100µg/kg KG und einem Perfusionsdruck von $36,8 \pm 5,3$ mmHg bzw. $34,3 \pm 2,9$ mmHg dem Werteverlauf der kardiodepressiven LPS-Herzen gleichen.

Unter dem Einfluß der mittleren c3ado-Konzentrationen (1 mg bzw. 5 mg/kg KG) liegen die Perfusionsdrücke der Gruppen 4 bzw. 5 zwischen denen der Gruppe 3 und 6, zeigen keinen signifikanten Unterschied und verändern sich nur geringfügig zum Ausgangswert.

In der Monotherapie mit c3ado (Gruppen 7-10) sticht kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe hervor. Dennoch lässt sich im Gruppenvergleich ein tendenziell niedrigerer Perfusionsdruck mit steigender c3ado-Konzentration registrieren. So liegt der Mittelwert der Gruppe 7 mit 8,8 mmHg bzw. 7,2 mmHg über dem der Gruppe 10.

Ein Effekt von Neplanocin lässt sich in den Gruppen 11-14 nicht feststellen. Ohne LPS-Applikation (Gruppen 11+12) gleichen die Mittelwerte dem der Normalgruppe, mit LPS (Gruppen 13+14) dem der LPS-Gruppe.

Mit Ende des Versuchsablaufs ($t = 60$ min) pendeln sich die Mittelwerte der Perfusionsdrücke aller Versuchsgruppen auf Ausgangsniveau ein.

4.4 Ergebnisse der Immunhistochemie

4.4.1 Histologische Beurteilung der Adhäsionsmoleküle

Die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 am Endothel der postkapillären Venolen wurde durch die Rotfärbung der APAAP-Methode histologisch sichtbar. Die verschiedenen Intensitätsstufen der Rotfärbung wurden an $n = 6$ Versuchsherzen pro Versuchsgruppe anhand der beschriebenen Färbegradeinteilung beurteilt. Angegeben werden die Mittelwerte und Standardabweichung.

4.4.1.1 Expression von ICAM-1

Bei einer 400-fachen Vergrößerung zeigte sich bei der Kontrollgruppe eine geringe Expression der konstitutiven ICAM-1 mit einem Färbegrad-Mittelwert von $0,43 \pm 0,14$. Im Gruppenvergleich galt dieser Wert als Normwert.

Im Kontrast zur Kontrollgruppe stand das immunhistochemische Mikroskopbild der LPS – stimulierten Herzen (Gruppe 2). Erwartungsgemäß war hier die erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls durch eine intensive Rotfärbung der Endothelien erkennbar.

Der Mittelwert belief sich auf $2,10 \pm 0,21$ und liegt damit signifikant über dem der Kontrollgruppe.

Die zusätzliche c3ado-Applikation der LPS-stimulierten Versuchstiere (Gruppen 3-6) bewirkte eine Reduktion der ICAM-1-Expression. Mit zunehmender c3ado-Konzentration sank der Mittelwert von $1,88 \pm 0,17$ (Gruppe 3) über $1,04 \pm 0,21$ (Gruppe 4) auf $0,84 \pm 0,15$ (Gruppe 5) und erreichte schliesslich in Gruppe 6 mit einem Mittelwert von $0,47 \pm 0,11$ Normalniveau.

In den Monotherapie-Gruppen 7-12 kam es unter der Verwendung von c3ado bzw. Neplanocin zu keinem signifikanten Anstieg der ICAM-1-Expression.

Die Mittelwerte der Endotoxin-behandelten Gruppen in Kombination mit Neplanocin (Gruppe 13+14) zeigten sich im Vergleich zur LPS-Gruppe unverändert. Mit Mittelwerten von $2,14 \pm 0,24$ (Gruppe 13) und $2,07 \pm 0,19$ konnte dosisunabhängig kein expressionsvermindernder Effekt von Neplanocin festgestellt werden.

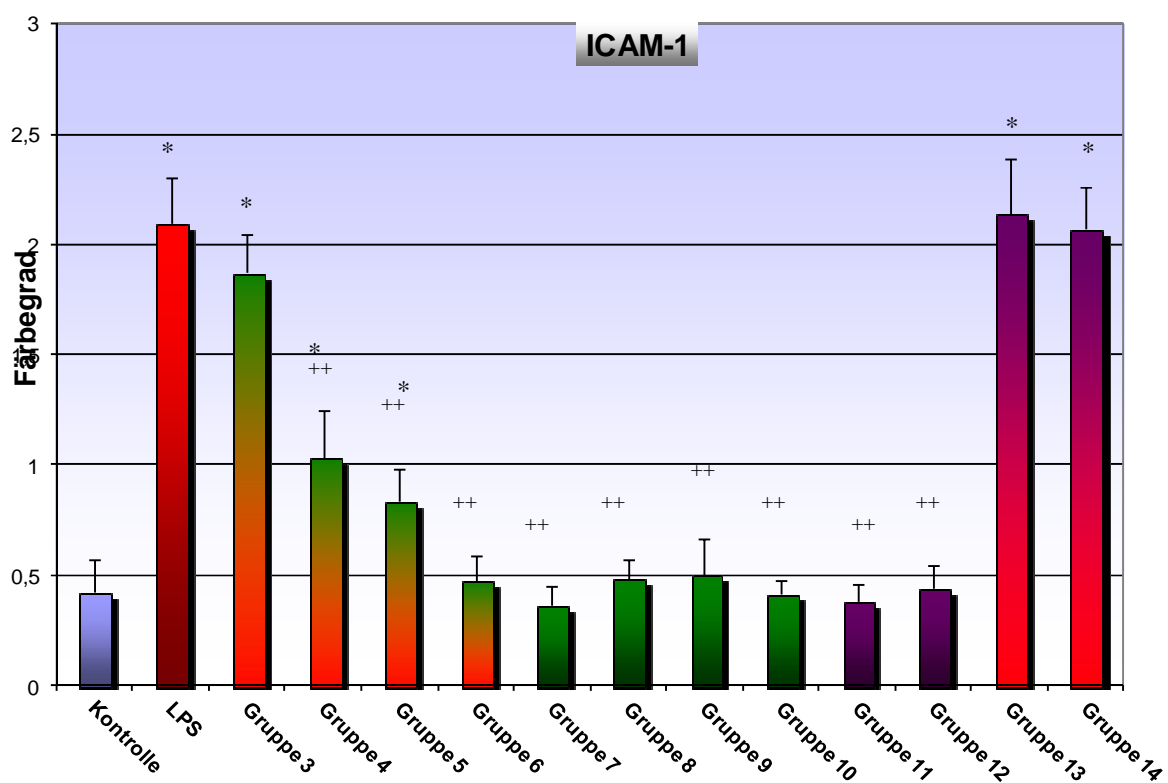


Abb. 24: ICAM-1-Expression angegeben als Mittelwert + Standardabweichung bei $n = 6$, bei 400-facher Vergrößerung. 100 Venolen pro Schnitt nach Färbegrad beurteilt (Grad 0 = keine bis Grad 3 = hohe Aktivität). * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$). ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

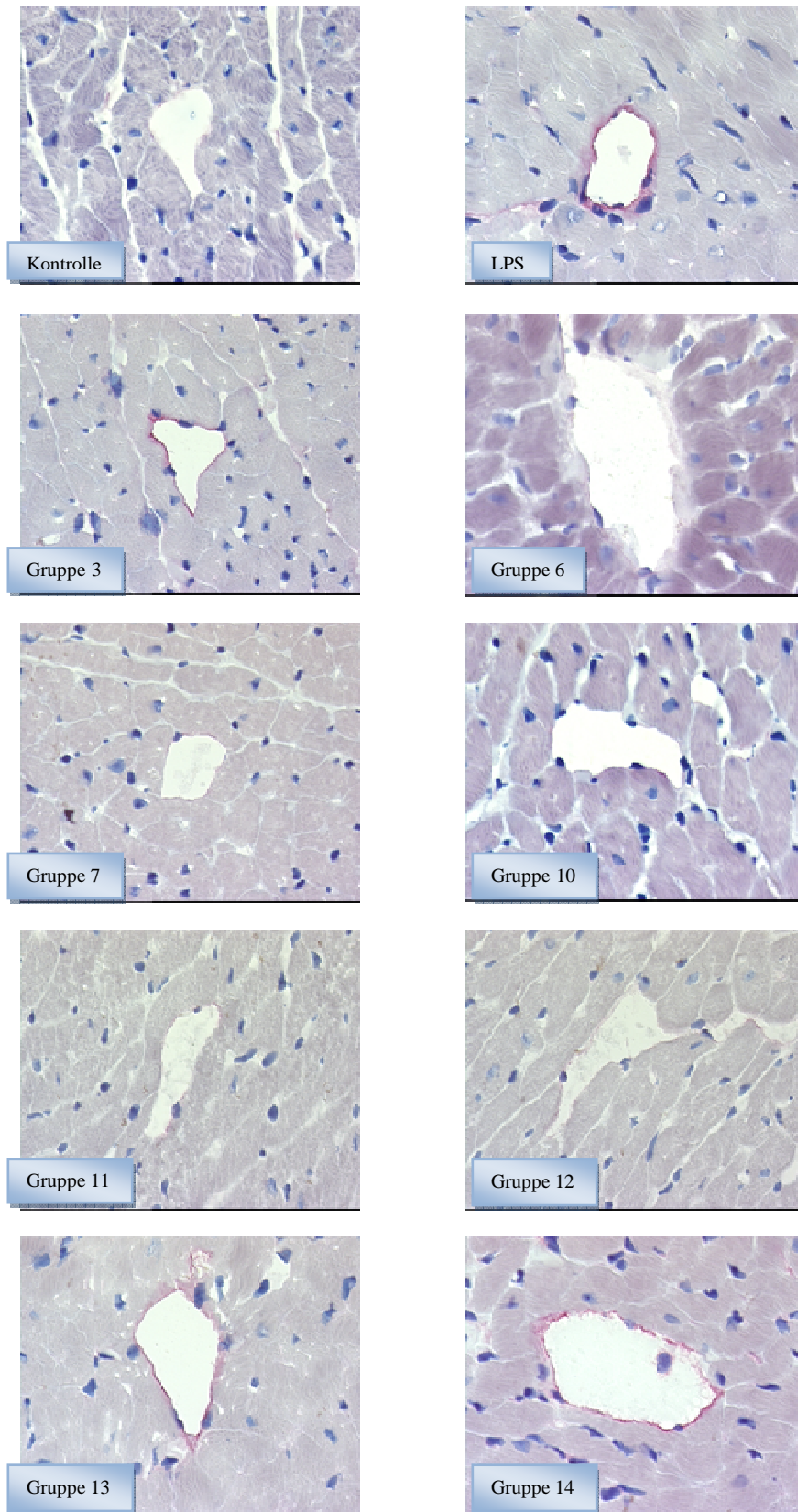


Abb. 25: Beispiele immunhistochem. Gewebsschnitte ICAM-1, 400fache Vergrößerung. Sichtbar wird die deutliche Rotfärbung der Endothelien LPS-behandelten Herzgewebes durch die Aktivierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1.

4.4.1.2 Expression von VCAM-1

Bei der Bewertung der Expression von VCAM-1 ergab sich ein ähnliches Wertediagramm wie bei ICAM-1.

Die LPS-Gruppe wies einen signifikant erhöhten Mittelwert von $2,42 \pm 0,28$ gegenüber $0,48 \pm 0,18$ der Kontrollgruppe auf.

Die Expression von VCAM-1 konnte ebenfalls durch c3ado (Gruppen 3-6) reduziert werden. Je höher die c3ado-Dosierung, desto geringer fiel die Intensität der Rotfärbung aus. In Gruppe 3, mit niedrigster c3ado-Konzentration, hob sich der Mittelwert mit $2,23 \pm 0,23$ nur geringfügig von dem der LPS-Gruppe ab. Bereits in Gruppe 4 wird die abfallende Tendenz mit einem Mittelwert von $1,53 \pm 0,20$ deutlich, der weiter abfällt auf $1,04 \pm 0,20$ in Gruppe 5 bis auf $0,81 \pm 0,19$ in Gruppe 6.

c3ado bzw. Neplanocin in der Monotherapie (Gruppen 7-12) verursachten keine signifikant gesteigerte VCAM-1-Expression. Die Werte der Versuchsgruppen blieben auf Normlevel; lediglich der Mittelwert von Gruppe 12 schien gegenüber der Kontrollgruppe mit $0,77 \pm 0,22$ leicht erhöht.

Ohne Effekt auf die Expression von VCAM-1 zeigte sich, wie bereits bei ICAM-1, die Applikation von Neplanocin bei LPS-vorbehandelten Versuchstieren (Gruppen 13+14). Ähnlich wie die LPS-Gruppe erreichten sie Mittelwerte von $2,40 \pm 0,27$ (Gruppe 13) und $2,46 \pm 0,22$ (Gruppe 14).

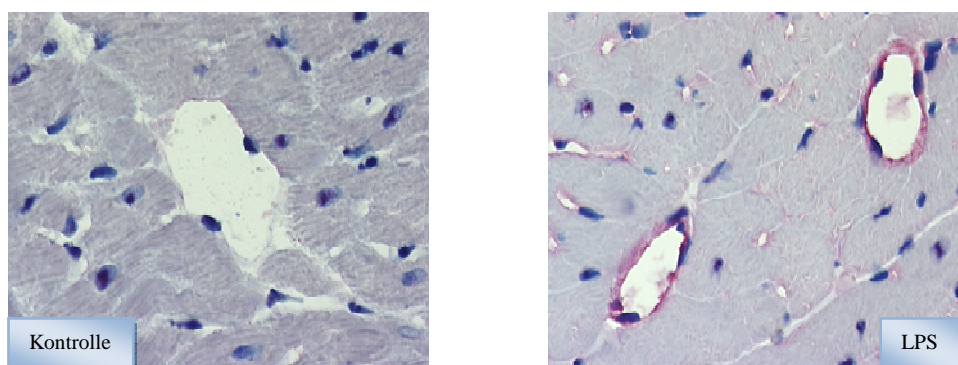


Abb. 26: Beispiele immunhistochem. Gewebsschnitte VCAM-1, 400fache Vergrößerung. Sichtbar wird die deutliche Rotfärbung der Endothelien LPS-behandelten Herzgewebes durch die Aktivierung des Adhäsionsmoleküls VCAM-1.

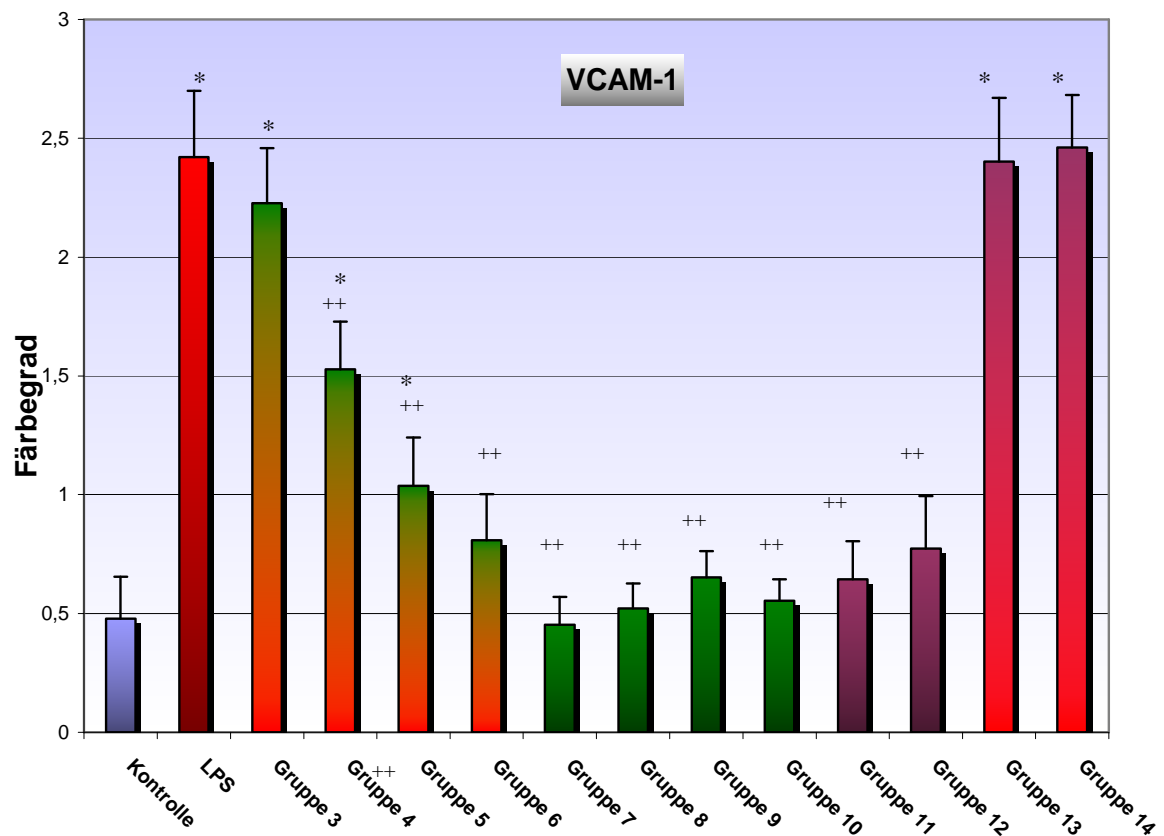


Abb. 27: VCAM-1-Expression angegeben als Mittelwert + Standardabweichung bei $n = 6$, bei 400-facher Vergrößerung. 100 Venolen pro Schnitt nach Färbegrad beurteilt (Grad 0 = keine bis Grad 3 = hohe Aktivität). * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$). ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

4.4.2 Marker der myokardialen Leukozytenakkumulation

Die Akkumulation der myokardialen Leukozyten wurde ebenfalls mittels der APAAP-Methode durch immunhistochemische Färbungen gegen die Leukozyten-Antigene ED1 und CD11b beurteilbar. Bei ED1 handelt es sich um einen spezifischen Marker für Gewebsmakrophagen, bei CD11b um einen Marker für aktivierte Leukozyten. Die Auszählung der positiv markierten Leukozyten erfolgte an $n = 6$ Versuchsherzen pro Versuchsgruppe. Angegeben werden die Mittelwerte und Standardabweichung.

4.4.2.1 Expression von ED1

Die Auszählung der Endotoxin-vorbehandelten Herzschnitte (LPS-Gruppe) ergab mit 126 ± 20 eine mehr als doppelt so hohe Anzahl ED1-positiver Zellen im Vergleich zur Normalgruppe (53 ± 8). Sie stellt einen signifikanten Unterschied zur Normalgruppe dar. Die Behandlung mit c3ado konnte den LPS-Effekt minimieren (Gruppen 3-6). Die Anzahl positiver Zellen sank mit zunehmender c3ado-Konzentration und erreichte in Gruppe 6 mit 57 ± 7 Kontrollgruppenniveau.

Während die Endotoxin-vermittelte Makrophagen-Akkumulation durch c3ado verhindert werden konnte, zeigte sich die Applikation von Neplanocin wirkungslos. Die Auszählung ED1-positiver Zellen in den LPS+Neplanocin-Gruppen 13 bzw. 14 ergaben mit 116 ± 18 bzw. 128 ± 18 der LPS-Gruppe entsprechende Zahlenwerte.

Keine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe war bei der Monotherapie mit c3ado bzw. Neplanocin (Gruppen 7-12) zu beobachten.

Die folgende Abbildung 28 gibt die Mittelwerte der ED1-positiven Zellen aller Versuchsgruppen wieder.

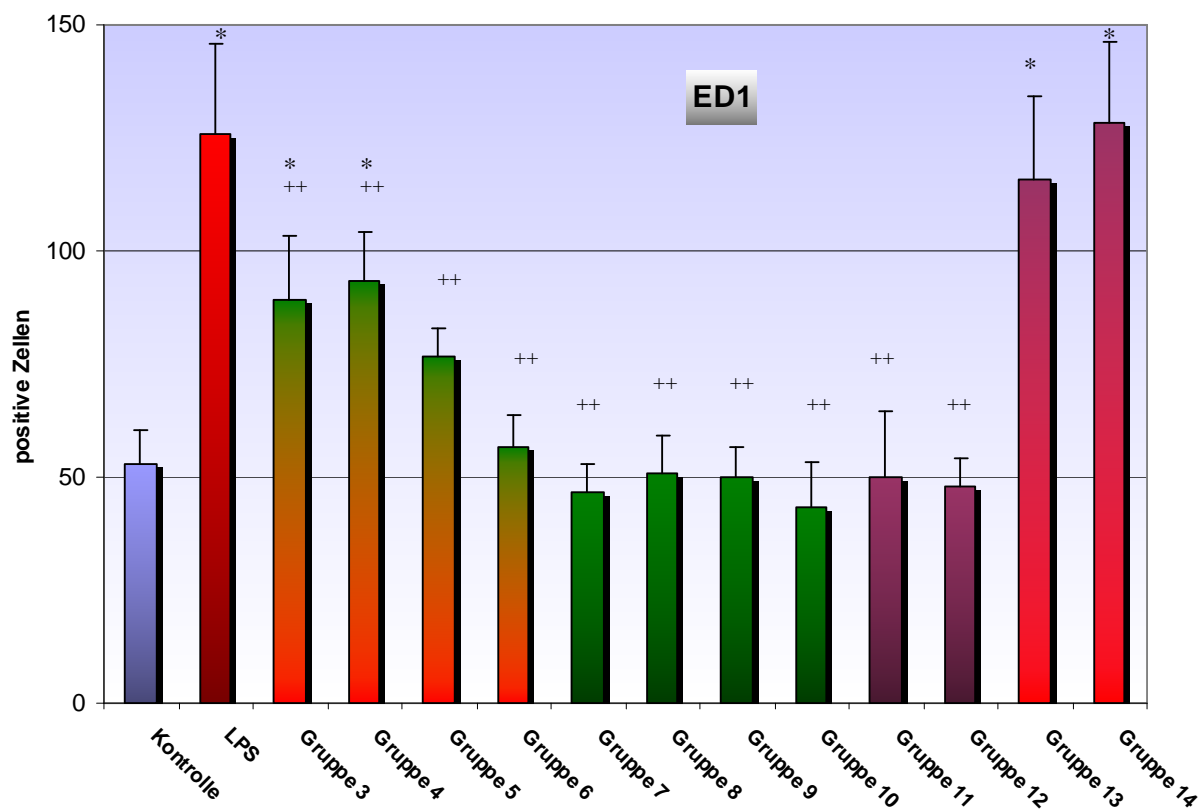


Abb. 28: Auszählung ED1-positiver Zellen, angegeben als Mittelwert + Standardabweichung bei $n = 6$, bei 400-facher Vergrößerung und 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$). ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

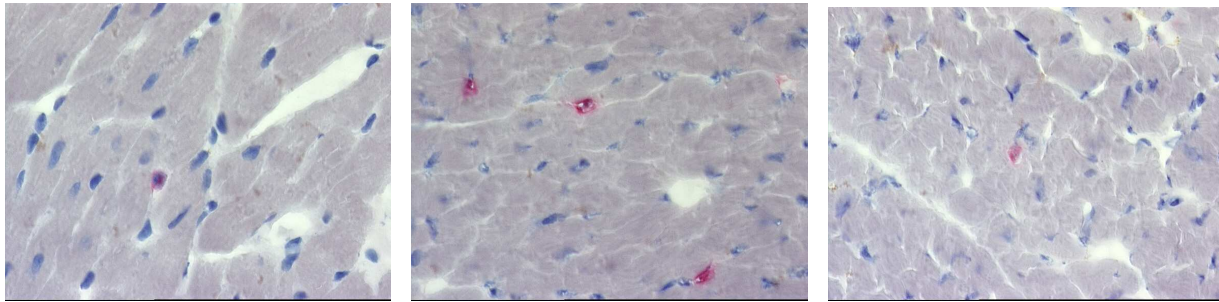


Abb. 29: Beispiel eines immunhistochemischen Gewebeschnittes mit ED1, 400-fache Vergrößerung. Leukozytenakkumulation (rot gefärbte Zellen) links Kontrollgruppe, Mitte nach LPS-Stimulation und rechts nach LPS + c3ado 10mg/kg KG (Gruppe 6)

4.4.2.2 Expression von CD11b

Endotoxin verursachte eine starke Akkumulation CD11b-positiver Leukozyten im Mikroskopbild und war mit einem Mittelwert von 78 ± 11 Zellen signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe mit 11 ± 3 .

c3ado (Gruppen 3-6) zeigte auch hier eine hemmende Wirkung auf die Leukozytenakkumulation und konnte mit der höchsten Konzentration von 10mg/kg KG in Gruppe 6 den Endotoxin-vermittelten Effekt verhindern. Mit einem Mittelwert von 13 ± 3 lag die Anzahl positiver CD11b-Zellen auf dem Normlevel der Kontrollgruppe und war signifikant reduziert gegenüber der LPS-Gruppe.

Wirkungslos hingegen blieb der Einsatz von Neplanocin bei den LPS-stimulierten Herzen der Gruppen 13 bzw. 14. Die Leukozytenanzahl bewegte sich um einen Mittelwert von 81 ± 10 bzw. 74 ± 13 und gleicht damit den Werten der LPS-Gruppe.

Wie bereits bei den vorangegangenen Untersuchungen ließ sich bei der jeweils isolierten Behandlung mit c3ado bzw. Neplanocin (Gruppen 7-12) keine Auswirkung

auf die Leukozytenakkumulation feststellen. Die Errechnung ihrer Mittelwerte ergab eine mit der Kontrollgruppe vergleichbare Anzahl CD11b-positiver Zellen.

Einen Überblick über die ermittelten Mittelwerte der Versuchsgruppen ist aus Abbildung 30 ersichtlich.

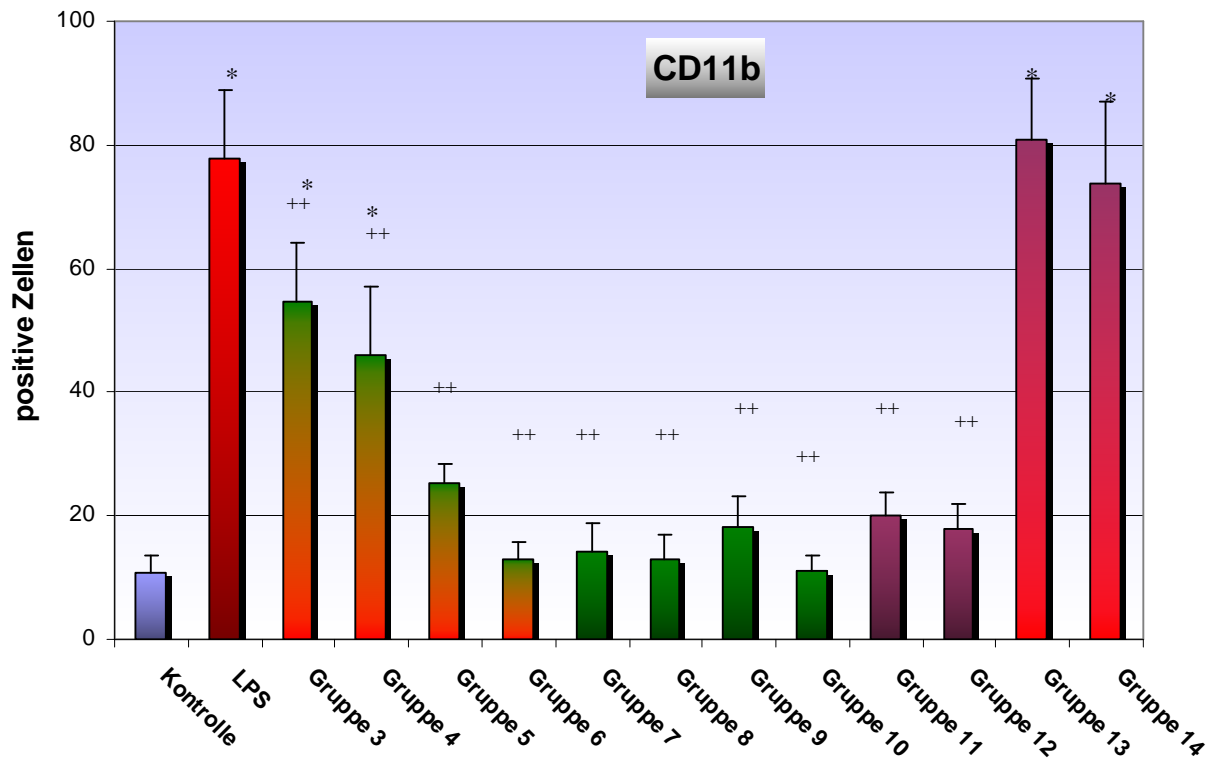


Abb. 30: Auszählung CD11b-positiver Zellen, angegeben als Mittelwert + Standardabweichung bei $n = 6$, bei 400-facher Vergrößerung und 10 Gesichtsfeldern pro Schnitt. * signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe ($p < 0,05$). ++ signifikanter Unterschied zur LPS-Gruppe ($p < 0,05$).

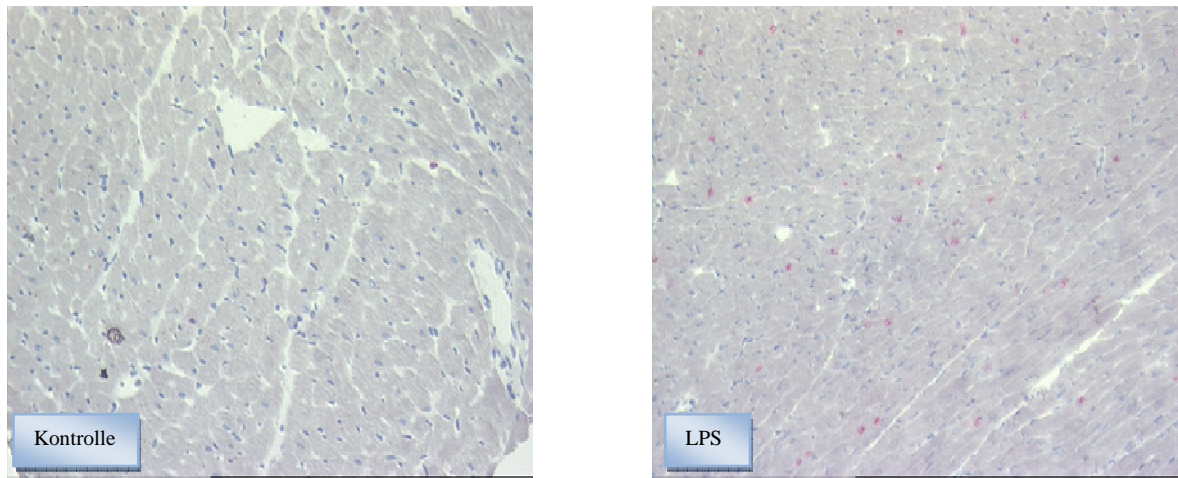


Abb. 31: Beispiel eines immunhistochem. Gewebeschnittes mit CD11b, 40-fache Vergrößerung. Rechts: Leukozytenakkumulation (rot gefärbte Zellen) nach LPS-Stimulation in

5 Diskussion

5.1 Herleitung der Fragestellung

Sepsis stellt nach wie vor eine ernstzunehmende klinische Komplikation dar. Ihr aggravierender Verlauf ist trotz aufwendiger intensivmedizinischer Apparatur mit einer hohen Letalität verbunden [2]. Mittlerweile ist bekannt, dass die systemischen Alterationen des septischen Verlaufs die Pumpfunktion des Herzens beeinträchtigen und zu einer massiven Herzinsuffizienz führen können. Die auftretenden kardialen Funktionsstörungen werden mit dem Begriff der septischen Kardiomyopathie zusammengefasst [6]. Klinisch äußern sie sich in einer Dilatation sowie verminderter Auswurfraction beider Herzkammern mit dem Unvermögen den in der Sepsis auftretenden verminderten Blutdruck zu kompensieren [6,7,9-12]. Der Pathomechanismus der septischen Kardiomyopathie ist bislang nur unzureichend geklärt, jedoch wird davon ausgegangen, dass mannigfaltige Komponenten der systemisch inflammatorischen Antwort zur Pathogenese der myokardialen Dysfunktion beitragen. Insbesondere „early response“- Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 [7] nehmen über den NF- κB Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Endothelzellen, kardialen Myozyten und Leukozyten ein. Die Expression von Adhäsionsmolekülen und weiteren Mediatoren führt zu endokardialen Schäden und rheologischen Veränderungen mit konsekutiver Beeinträchtigung der koronaren Mikrozirkulation und kardialer Kontraktilität [88,90,100,107]. Während noch vor wenigen Jahren die Hypothese einer Globalischämie für die myokardialen Funktionsstörungen verantwortlich gemacht wurde [31-33], weisen in jüngster Zeit vermehrt Studien auf eine unphysiologische Verteilung der Durchblutung mit einem Nebeneinander von über- und minderperfundierten Arealen hin [39,42,93]. Ähnliche Mikrozirkulationsstörungen mit der Entwicklung von funktionellen Shunts sind bereits bei den Beeinträchtigungen anderer Organsysteme während der Sepsis bekannt [154,155]. Neben Mikrozirkulationsstörungen wird eine direkte Einwirkung durch Zytokine [15-17] sowie vasoaktive Substanzen [72-81] in kausalen Zusammenhang mit der Entstehung der kardialen Dysfunktion gebracht [6-10,12].

Die Entwicklung von Therapiestrategien zur Behandlung des septischen Krankheitsbildes gilt weiterhin als Herausforderung der klinischen Forschung. Zahlreiche natürlich vorkommende und synthetisierte Inhibitoren des NF- κB Signalwegs sowie der Transmethylierungsreaktion werden in der Literatur als therapeutische Intervention beschrieben. 3-Deazaadenosin (c3ado) stellt eine

Substanz dar, die beide Eigenschaften vereinigt [62-71]. In den Studien von Dietrich und Schoaff [153] wurde c3ado in einer fixierten Konzentration als Therapieansatz bei LPS-induzierten septischen Ratten untersucht. Auf unterschiedlichen Ebenen der septischen Reaktionskaskade konnte dabei c3ado einen antiinflammatorischen kardioprotektiven Einfluß entfalten.

In dieser Arbeit sollte eine Dosiswirkungsbeziehung sowie ein möglicher Erklärungsansatz für die Wirkungsweise von c3ado untersucht werden. Für letzteres verwendeten wir einen weiteren Methylierungsinhibitor, Neplanocin A, von dem bislang kein Einfluß auf die NF-kB Aktivität bekannt ist.

5.2 LPS verursacht kardiale Funktionsstörung – c3ado kardioprotektiv

Bakterielles Lipopolysaccharid (LPS = Endotoxin) ist bekannt als potenter Auslöser des septischen Krankheitsbildes [26-32] mit der Aktivierung einer Reihe unterschiedlicher Effektor-Kaskaden wie des Komplement-, Gerinnungs-, Bradykinin- und hämatopoetischen Systems sowie der Freisetzung zahlreicher Zytokine.

Klinisch ruft die Injektion von Endotoxin das hämodynamische Profil des septischen Schocks hervor mit den pathogonomischen Zeichen wie Tachykardie, vermindertem systemischen Gefäßwiderstand und linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF), erhöhter Compliance sowie linksventrikulärer Dilatation [9,10,26]. In in-vitro Studien wurde nach Endotoxinexposition bei der Perfusion isolierter Rattenherzen bereits im frühen Stadium eine deutlich verminderte Kontraktilität nachgewiesen [153,156]. Bei gesunden Probanden führte die Applikation von LPS mit konsekutiver Erhöhung von TNF α nicht nur über veränderte Last- und Frequenzbedingungen zu einer Herabsetzung der myokardialen Pumpfunktion, sondern rief eine reversible intrinsische Abnahme der myokardialen Leistung hervor [26].

Auch in dieser Arbeit konnten wir durch LPS-Injektion bereits in der Frühphase das klinische Bild der Sepsis hervorrufen. Dabei wählten wir eine Inkubationszeit mit Endotoxin von acht Stunden, da sich anhand einer durchgeführten Untersuchungsreihe markante Wertveränderungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ergaben und insbesondere die auch in der Literatur beschriebenen Maximalwerte bei der ICAM-1 und VCAM-1-Färbung (siehe weiter unten) erreicht wurden. So zeigte sich unter Endotoxin bei der Perfusion der isolierten Rattenherzen eine erhebliche kardiale Funktionsbeeinträchtigung. Die Messergebnisse des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) und der maximal entwickelten linksventrikulären

Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max}) ergaben signifikant reduzierte Werte und können als Ausdruck einer massiven kardialen Depression gewertet werden.

Die Behandlung der LPS-stimulierten Herzen mit c3ado erfolgte aufgrund der geringen Halbwertszeit [168] zu den Zeitpunkten $t = -30$ min und $t = 4$ h. Mit der 30minütigen Vorinjektion von c3ado sollte zu Versuchsbeginn im Sinne eines *pre-treatment model* ein suffizienter c3ado-Wirkspiegel bereitgestellt und die Möglichkeit einer Interaktion zwischen c3Ado und LPS bei gleichzeitiger Injektion ausgeschlossen werden.

Unter der c3ado Therapie nahmen die Messwerte des LVDP und dP/dt_{\max} dosisabhängig zu. Ausgehend von der geringsten Dosierung in einer Konzentration von 100 μ g über 1 mg, 5 mg und schließlich 10 mg c3ado konnten wir eine stetige Zunahme der Messwerte dokumentieren. In der höchsten Dosierung von 10 mg entfaltete c3ado eine maximal kardioprotektive Wirkung – die Messwerte des LVDP und dP/dt_{\max} lagen dabei auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

In unserem Sepsismodell konnte ebenso der bekannte modifizierende Einfluss von Endotoxin auf Katecholamine demonstriert werden. So scheint bei der septischen Kardiomyopathie die vasoaktive Sensitivität zu Katecholaminen und sympathischer Stimulation erheblich vermindert [15,39], wodurch die in der Sepsis auftretenden Mikrozirkulationsstörungen begünstigt werden. Eine selektive Reduktion der Isoproterenol-vermittelten Kontraktilität um 75% konnte bereits in vorangegangenen Studien durch die Exposition mit IL-1 und $TNF\alpha$ nachgewiesen werden [157,158].

Wir stellten während des Perfusionsverlaufs bei der Applikation von Katecholaminen ebenfalls eine deutlich reduzierte Ansprechbarkeit fest, die sich in einer signifikant verminderten maximalen Druckantwort widerspiegelte. Das verdeutlicht, dass Endotoxin vermutlich auch über eine Herabsetzung der Katecholamin-vermittelten Aktivierung myokardialer Adrenorezeptoren zu kardialen Pumpfunktionsstörungen beiträgt.

Die Auswertung des koronaren Perfusionsdruckes, die den koronaren Gefäßtonus repräsentiert, ergab im Vergleich zwischen Kontroll-, LPS- und Therapie-Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Erst nach 15-minütiger Adrenalinzufuhr äußerte sich eine verminderte Katecholamin-Sensitivität der LPS-stimulierten Herzen in einem verminderten Perfusionsdruck-Anstieg, der sich unter steigender c3ado-Dosierung wieder dem Niveau der Kontrollgruppe annäherte. Eine Makrozirkulationsstörung mit konsekutiver Globalischämie als Ursache der kardialen Funktionsstörungen erweist sich hiermit als unwahrscheinlich. Unterstützt werden diese Beobachtungen durch die Ergebnisse von Dietrich und Schoaff [153] sowie Grandel et al. [156], die ebenso keine

Veränderungen des Perfusionsdruckes an LPS-stimulierten und isoliert perfundierten Rattenherzen nachweisen konnten.

Im Gegensatz zu c3ado zeigte die Behandlung mit Neplanocin keinen kardioprotektiven Effekt. Sowohl in der Konzentration von 1 mg/kg KG als auch 10 mg/kg KG blieb Neplanocin bei der Aufzeichnung der kardialen Funktionsparameter wirkungslos.

5.3 Dosisabhängige Expressionshemmung von Adhäsionsmolekülen + Inhibition der Leukozytenmigration

Die Infiltration keimbesiedelten Gewebes durch Leukozyten ist ein wichtiger Bestandteil der körpereigenen unspezifischen Immunantwort. Bevor ein Leukozyt über das Endothel ins Gewebe übergeht, durchläuft er nach heutiger Vorstellung verschiedene Schritte der Adhäsionskaskade, bei der zahlreiche Adhäsionsmoleküle auf leukozytärer und endothelialer Seite eine zentrale Rolle einnehmen [107,108]. Insbesondere die leukozytären β 2-Integrine wie MAC-1 (CD11b/CD18) und die endothelialen Liganden ICAM-1 sowie VCAM-1 sind von entscheidender Bedeutung bei der Interaktion zwischen Leukozyt und Endothel [113,119]. Die Aktivierung des Endothels löst einen komplexen Inflamationsprozess aus. Hierbei imponiert die therapeutische Blockade der Leukozytenadhäsion als attraktive Interventionsmöglichkeit. Aus diesem Grunde untersuchten wir in unserer Arbeit über die Expression von Adhäsionsmolekülen die dosisabhängige inhibierende Wirkung von c3ado auf die Leukozytenadhäsion.

ICAM-1 und VCAM-1 werden in geringer Menge konstitutiv von ruhenden Endothelzellen exprimiert, jedoch erfahren sie nach Stimulation durch Endotoxin oder Zytokine, wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-1, eine deutliche Hochregulation. Bereits nach wenigen Stunden erreichen die Werte ihr Maximum und können als Prognosefaktor für die Entwicklung einer organischen Dysfunktion genutzt werden [89,86,108-115]. Nach intravenöser Gabe von $\text{TNF}\alpha$ an Mäusen konnten Henninger et al. nach 2 bis 5 Stunden einen deutlichen Anstieg von ICAM-1 und VCAM-1 im Myokard nachweisen [163]. Die Maximalwerte wurden nach 5 bis 9 Stunden erreicht.

In unserem Versuchsmodell wählten wir eine 8-stündige Inkubationszeit mit Endotoxin bzw. c3ado gefolgt von der immunhistochemischen Bestimmung der Adhäsionsmoleküle. Auch in unserer Arbeit konnten wir eine geringe konstitutive Expression von ICAM und VCAM nachweisen, während nach Endotoxinapplikation eine erheblich gesteigerte Expression festzustellen war. CD11b, als Marker für aktivierte Leukozyten - und ED1, als Marker für Gewebsmakrophagen, waren ebenfalls

deutlich hochreguliert. Mithilfe von c3ado in vier unterschiedlichen Konzentrationen konnten wir dosisabhängig die LPS-vermittelte gesteigerte Expression von ICAM-1, VCAM-1, CD11b und ED1 reduzieren bzw. hemmen. Unter steigender c3ado-Konzentration nahm die Expression stetig ab. Die höchste Dosierung von 10 mg c3ado/kg KG erwies sich dabei als maximal effektiv – die ermittelte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und Cd11b entsprachen den Ausgangswerten der Kontrollgruppen. c3ado scheint dosisabhängig während der Sepsis über die potente Expressionshemmung von Adhäsionsmolekülen die Aktivierung der Leukozyten und deren Adhäsion am Gefäßendothel zu reduzieren. Anhand weiterführender Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wird diese Beobachtung durch die gewonnenen Erkenntnisse der Intravitalmikroskopie an mesenterischen Venolen unterstützt. Hier ließ sich durch die c3ado-Applikation die gesteigerte LPS-vermittelte Leukozytenadhäsion signifikant vermindern [153]. Darüberhinaus vermochte c3ado die LPS-induzierte Produktion leukozytärer Sauerstoffradikale (ROS) und die Freisetzung an Stickstoffmonoxid (NO) signifikant zu senken, welches sich auf eine herabgesetzte Leukozytenaktivierung, -akkumulation und konsekutiv verminderte endotheliale Adhäsion zurückführen lässt [153,16]. Dabei stellen ROS und NO bekannte Mediatoren der septischen Kardiomyopathie dar [72,74,77,79,81].

Durch die herabgesetzte Leukozytenaktivierung resultiert eine verminderte bzw. blockierte Transmigration von Entzündungszellen ins interstitielle Gewebe, was wir in dieser Arbeit über die ermittelten ED1-Werte, als Marker für Gewebsmakrophagen, bestätigen konnten. Hierbei verminderte sich mittels c3ado konzentrationsabhängig die Anzahl aktivierter Gewebsmakrophagen - in höchster c3ado-Dosierung hatte sich der ED1-Wert auf Normalniveau zurückgebildet.

Im Gegensatz zu c3ado konnten wir mit der Injektion des Methylierungsinhibitors Neplanocin keinen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen feststellen. Neplanocin blieb somit auch bei der immunhistochemischen Untersuchung ohne messbare kardioprotektive Wirkung.

5.4.1 Hämoprotektive Wirkung von c3ado auf das Blutbild im Sepsismodell - ein zytotoxischer Eigeneffekt?

Beim septischen Krankheitsbild zeigen sich neben den Alterationen der kardialen Funktionsparameter periphere Blutbildveränderungen, die sich in einer anfänglichen Neutropenie gefolgt von einer Linksverschiebung und Erhöhung der Leukozytenzahl durch die Ausschwemmung unreifer junger neutrophiler Granulozyten aus dem

Rückenmark ins periphere Blut äußert [39]. Dabei verkürzt sich während der Sepsis die Transitzeit - es kommt zur Stimulation einer verstärkten Neubildung von Granulozyten. Eine Leukozytose mit Linksverschiebung kann schon früh im Krankheitsverlauf als diagnostischer Marker für eine bakterielle Infektion genutzt werden. Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führt zu veränderter Zelladhäsion mit nachfolgender Sequestrierung der Granulozyten aus der Zirkulation ins Gewebe, Phagozytose, Degranulation, Generierung von Sauerstoffradikalen [16] und Produktion von proinflammatorischen Mediatoren [39]. Obgleich ihre Aktivierung eine wichtige Antwort des unspezifischen Immunsystems darstellt, wird sie während der Sepsis mit der Entstehung von Myokardschäden und folgender Dysfunktion in Verbindung gebracht [8,39,45,82,83]. Insbesondere die Retention aktivierter Leukozyten im Kapillarbett und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen werden in der Literatur erwähnt [82,83,86].

Bei der Blutbildbestimmung in unserem Tiermodell fanden wir acht Stunden nach Endotoxinapplikation ebenfalls eine Linksverschiebung mit starkem prozentualen Anstieg der segment- und stabkernigen Granulozyten. Der bei Ratten physiologischer Weise hohe Lymphozytenanteil war dabei deutlich reduziert, während die Gesamtzellzahl bei allen Versuchsgruppen auf Referenzbereich blieb. Durch die Behandlung mit steigender c3ado-Dosierung ließ sich die LPS-vermittelte Linksverschiebung zunehmend aufheben. Bei der höchsten c3ado-Dosierung von 10 mg/kg KG hatten sich die Blutwerte auf das Niveau der Kontrollgruppe normalisiert. Wie bei der Auswertung der kardialen Funktionsparameter erwies sich c3ado auch hinsichtlich des Blutbildes als protektive Therapiestrategie im Sepsismodell. Interessanterweise veränderte sich jedoch unter der Monotherapie mit c3ado ebenfalls das Differentialblutbild. c3ado alleine führte zu einer Linksverschiebung, wenngleich in einem deutlich geringeren Ausmaß als in der LPS-Gruppe.

Die Anwendung von Neplanocin A in der Monotherapie resultierte in einer ähnlichen Blutbildanalyse, so dass der Verdacht einer über die Inhibition der Methylierungsreaktion regulierten Veränderung nahe liegt. Scheinbar nehmen beide Methylierungsinhibitoren Einfluss auf die Blutbilddifferenzierung. In der Therapiegruppe entfaltete Neplanocin jedoch keine kardioprotektive Wirkung (siehe Diagramm 6).

Es bleibt die Frage weshalb c3ado und Neplanocin in der Monotherapie zu einer Linksverschiebung führen. Läßt sich die Veränderung des differenzierten Blutbildes auf einen zytotoxischen Eigeneffekt zurückführen?

Bei der Literaturrecherche finden sich bei früheren Studien hinsichtlich einer immunsuppressiven Wirkung von c3ado in einer Dosierung von 100 mg/kg KG über 4 Tage bei CBA/J Mäusen keinen Anhalt für eine zytotoxische Wirkung [169]. Darüber hinaus waren in einer Multi-Center Studie zur Überprüfung der Behandlungseffektivität

von c3Ado bei rheumatoider Arthritis keine toxischen Nebenwirkungen bei Probanden aufgetreten, denen c3ado in einer Dosierung von 200 mg/Tag über 4 Wochen appliziert wurde [170].

Im Zuge weiterer Blutbilduntersuchungen bestimmten wir den Serumwert der Lactatdehydrogenase (LDH), ein Enzym das ubiquitär im Gewebe vorkommt und daher insbesondere bei Gewebe- bzw. Zellschäden als Marker für eine gesteigerte Hämolyse nachweisbar ist. So ist bekannt, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis häufig erhöhte Werte beobachtet werden. In der Studie von Zein et al. ließen sich bei septisch erkrankten Patienten signifikant erhöhte LDH-Serumwerte sowie eine signifikante Korrelation mit der Entwicklung des Multiorganversagens (MODS) feststellen. Letale Ausgänge waren ebenfalls mit einem erhöhten LDH-Wert assoziiert [162].

Die Bestimmung des LDH- Serumwertes bei den LPS-Tieren unserer Arbeit zeigte eine Verdoppelung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Einen protektiven Effekt unter c3ado-Therapie war nicht zu erkennen. Die LDH-Werte nahmen mit zunehmender c3ado-Konzentration sowohl in den Therapie- als auch Monotherapiegruppen zu. Jedoch lassen stetig im Referenzbereich liegende Erythrozyten-, Hämoglobin- und Leukozytenwerte weniger einen ursächlichen zytotoxischen Eigeneffekt von c3ado vermuten – hier wären ebenso Veränderungen im Sinne eines anämischen und leukopenischen Blutbildes zu erwarten – eine gesteigerte Hämopoese mit Linksverschiebung bei einem erhöhten Zellumsatz durch die Aktivierung des Immunsystems wäre jedoch denkbar. Während die Anzahl der Erythrozyten sowie der Hämoglobin- und Hämatokritwert bei allen Versuchsgruppen im Referenzbereich lag, verringerte sich die Thrombozytenzahl unter LPS-Injektion auf knapp die Hälfte des Kontrollgruppenwertes. Ein solcher Thrombozytenverbrauch ist für das Blutbild des dynamischen Sepsisgeschehens bekannt und lässt sich mit der Aktivierung des Gerinnungssystems erklären [159]. Sepsis stellt einen erwiesenen Risikofaktor für die Entstehung von Thrombozytopenien bei akut erkrankten Patienten dar. Der Schweregrad der Sepsis korreliert u.a. mit der Verringerung der Thrombozytenzahl [160,161].

Unter c3ado erwies sich die LPS-vermittelte Thrombozytopenie als rückläufig. In der höchsten c3ado-Dosierung normalisierte sich die Thrombozytenzahl auf Ausgangsniveau. Keine Veränderung der Thrombozytenzahl ergab sich unter der Behandlung mit Neplanocin. Damit scheint c3ado dosisadaptiert der Thrombozytenaktivierung im Sepsisgeschehen entgegen zu wirken und somit ebenso auf der Ebene des Gerinnungssystems einen antiinflammatorischen und methylierungsunabhängigen Effekt zu entfalten.

Blutwerte / Versuchsgruppen	c3ado- Monotherapie Gruppe 7-10	LPS + c3ado Gruppe 3-6	Neplanocin- Monotherapie Gruppe 11-12	LPS + Nepl Gruppe 13-14
Leukozyten (/μl)	im Referenzbereich (i.R.)	i.R.	i.R.	i.R.
<i>Lymphozyten</i> (%)	↓	Normalisierung der Werte mit zunehmender c3ado- Konz.	↓	Keine Wirkung von Neplanocin (Werte gleichen denen der LPS- Gruppe)
<i>Segmentkernige</i> (%)	↑		↑	
<i>Stabkernige</i> (%)	↑		↑	
Thrombozyten (x 10 ³ /μl)	i.R.		i.R.	
LDH Kontrollgruppe: 83 LPS-Gruppe: 169	↑ mit zunehmender c3ado- Konz. (129 - 423)	↑ mit zunehm. c3ado- Konz. (145 - 1718)	Keine Wirkung von Neplanocin (Werte gleichen denen der Kontrollgruppe)	Keine Wirkung von Neplanocin (Werte gleichen denen der LPS- Gruppe)

Diagramm 6: Zusammenfassende Übersicht der relevanten Blutbildveränderungen im Vergleich der Mono- und Therapiegruppen

5.5 Keine Kardioprotektive Wirkung von Neplanocin – Erklärungsansatz für die Wirkungsweise von c3ado?

In der Literatur werden zahlreiche antiinflammatorische Eigenschaften mit c3ado in Verbindung gebracht (siehe Diagramm 5), dessen Wirkmechanismus hauptsächlich mit der Blockierung von Transmethylierungsreaktionen und des NF-kB pathways beschrieben werden. Mit Neplanocin kam in dieser Arbeit ein weiterer Methylierungsinhibitor zur Anwendung, von dem kein Einfluss auf den NF-kB Signalweg bekannt ist.

Mit den Untersuchungen dieser Arbeit konnten wir demonstrieren, dass Neplanocin bei der induzierten septischen Kardiomyopathie keine protektive Wirkung entfaltet. Anders als mit c3ado konnten wir weder bei den Perfusionsmessungen, den immunhistochemischen Untersuchungen noch bei der Blutbildanalyse einen kardioprotektiven Einfluß von Neplanocin nachweisen. Damit lassen die Untersuchungsergebnisse vermuten, dass sich das kardioprotektive Potential von

c3ado nicht auf eine methylierungsabhängige Eigenschaft, sondern womöglich auf eine Interaktion mit dem NF-kB Signalweg zurückführen lässt.

Seit der Erstbeschreibung von NF-kB durch Sen und Baltimore [149] im Jahre 1986 deuten zahlreiche in vivo und in vitro Untersuchungen auf die weitreichende pathogenetische Bedeutung des NF-kB beim septischen Krankheitsbild hin. NF-kB nimmt über die Induktion proinflammatorischer Genexpression eine zentrale Rolle bei der ablaufenden septischen Reaktionskaskade ein und kann mit der folgenden Codierung und Synthese von Entzündungsmediatoren mit den in dieser Arbeit beschriebenen kardialen Funktionsstörungen in Verbindung gebracht werden. Insbesondere die nachweislich gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 sowie von Zytokinen, wie IL-1 β , IL-6, TNF α , Wachstumsfaktoren und Enzymen, wie iNOS, rufen über multiple und eng miteinander verflochtene Effektor-kaskaden eine massive kardiale Beeinträchtigung hervor [6-12,21-30].

LPS gramnegativer Bakterien hat sich dabei als potenter Auslöser der über toll-like receptor vermittelten NF-kB Aktivität erwiesen [150]. Die mit Endotoxin verbundene Karenzzeit von einigen Stunden bis zum Auftreten von kardialen Dysfunktionen lässt vermuten, dass es sich nicht um eine direkte Wirkung von Endotoxin selbst, sondern um eine mediatorvermittelte Reaktionskaskade handelt [9,12].

Der Arbeitsgruppe Suffredini et al gelang es in diesem Zusammenhang eine erhöhte Serum-Konzentration von TNF α nach Endotoxinexposition nachzuweisen [26]. Gleiches gelang unserer Arbeitsgruppe mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), das innerhalb der ersten zwei Stunden nach LPS-Stimulation signifikant erhöhte TNF α sowie IL-1 β Serumwerte lieferte. Während die Behandlung mit c3ado den LPS-induzierten Anstieg von TNF α nahezu zu verhindern vermochte, blieb IL-1 β unbeeinflusst [153].

Ebenso gelang es unserer Arbeitsgruppe mittels electrophoretic mobility shift assay (EMSA) einen deutlichen Anstieg der NF-kB Bindungsaktivität im Herzgewebe von Ratten innerhalb von 30 min nach LPS-Exposition zu ermitteln, die bis zu zwei Stunden anhielt und im späteren Verlauf auf Kontrollniveau abfiel. Mit c3ado ließ sich die Steigerung der NF-kB Bindungsaktivität im Myokard der LPS-behandelten Ratten verhindern [153].

Der genaue Wirkmechanismus von c3ado bleibt dabei weiterhin ungeklärt. Zahlreiche in der Literatur beschriebene Behandlungsstrategien auf der Basis der NF-kB Inhibition verdeutlichen nicht nur die Vielfalt potentieller Angriffspunkte - über die ebenso eine antiinflammatorische kardioprotektive Wirkung von c3ado in Betracht kommen könnte - sondern auch das Wirkungsmaß und die therapeutische Konsequenz der NF-kB

Inaktivierung im Sepsisgeschehen. Deshalb seien einige weitere Substanzen genannt wie beispielsweise Polyphenol, das über die Inhibition der TNF α -induzierten Degradierung von I κ B den NF-kB Signalweg blockiert und eine Senkung der Endotoxin-vermittelten Letalität herbeiführt [151]. Parthenolide, ein pflanzliches Präparat von „Asteraceae“-Blüten, verbesserte ebenfalls über die Hemmung der I κ B-Degradierung und des Enzyms IKK die kardiovaskuläre Funktion in septischen Ratten und steigerte die Überlebensrate von Mäusen mit endotoxischem Schock [152]. Die antiinflammatorische Wirkung der „non-steroidal antiinflammatory drugs“ (NSAIDs), wie Aspirin, wird neben der Cyclooxygenase-Hemmung, der Blockierung Endotoxin/Zytokin-vermittelten Translokation von NF-kB in den Zellkern zugeschrieben [164].

5.6 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Während das durch Endotoxin-vermittelte Krankheitsbild einen Überblick über die Dynamik des gram-negativen septischen Schocks erlaubt, bleiben allerdings bedeutsame Unterschiede bei der Präsentation des klinischen septischen Schock-Szenarios und der experimentellen Endotoxinämie zu erwarten. Insbesondere stellt LPS durch die Einmalgabe im Tierexperiment einen Mediator mit limitierter Kapazität dar.

Zudem käme einer klinischen Situation die Erstexposition mit dem Krankheitserreger LPS näher, als das von uns gewählte *pre-treatment model*. Daher erscheint die Übertragung der in dieser Arbeit gewonnen relevanten Erkenntnisse auf die klinische Situation nur bedingt möglich.

Dennoch wird deutlich, dass Bakterien selbst in ihrer Abwesenheit über Pathogenitätsfaktoren das septische Krankheitsbild auslösen können und dabei interessanterweise über offensichtlich unterschiedliche Mediatorsysteme zur Ausprägung der septischen Kardiomyopathie beitragen. Die Blockierung einzelner Mediatorwege, wie die in dieser Arbeit gezeigte Inhibition der Methylierungsreaktion oder die bislang fehlenden durchschlagigen Therapieerfolge mit Antizytokinstrategien, [166,167] verdeutlichen das multifaktorielle Sepsisgeschehen und das bisher nur unzureichende Sepsis-Verständnis. Dennoch scheinen Behandlungsstrategien auf der Basis der NF-kB Inaktivierung, wie anhand von 3-Deazaadenosin veranschaulicht, eine dosisabhängige antiinflammatorische kardioprotektive Wirkung zu entfalten und stellen damit für zukünftige klinische Studien in der Sepsisbehandlung einen interessanten Therapieansatz dar.

6 Zusammenfassung

Der progrediente Verlauf der Sepsis ist neben zahlreichen anderen Organdysfunktionen von massiven kardialen Funktionsstörungen begleitet, für deren Bezeichnung sich in den vergangenen Jahren das Krankheitsbild der septischen Kardiomyopathie etabliert hat. Pathophysiologisch zeichnet sie sich, trotz eines erhöhten Herzminutenvolumens, durch eine zunehmende Ventrikeldilatation sowie Hypokinesen des Myokards aus, die konsekutiv zu einer verminderten ventrikulären Auswurfraction und einer erhöhten Ventrikelcompliance führen. Letztlich resultiert das Unvermögen des Herzens, den deutlich gesunkenen systemischen Blutdruck des septischen Patienten adäquat zu kompensieren. Trotz beachtlichen intensivmedizinischen Fortschritts bleibt die Letalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks mit über 50% nach wie vor sehr hoch. Von pathogenetischer Bedeutung ist die Invasion von Erregern und deren Pathogenitätsfaktoren, wie z.B. Endotoxin (LPS) gramnegativer Bakterien, die verschiedene, eng miteinander verflochtene Signalwege aktivieren und die inflammatorische Reaktion hervorrufen. Dazu gehören u.a. die Aktivierung von Leukozyten, Endothelzellen, des Transkriptionsfaktors NF- κ B sowie die Freisetzung von Zytokinen. 3-Deazaadenosin (c3ado), einem potenten Methylierungshemmer und Inhibitor des NF- κ B Signalwegs, konnte in vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe am LPS-induzierten Rattenmodell eine kardioprotektive Wirkung nachgewiesen werden. Als Ziel dieser Arbeit galt es deshalb, Erkenntnisse für die Dosis-Wirkungsbeziehung von c3ado und einen möglichen Erklärungsansatz über die kardioprotektive Wirkungsweise zu finden. Unter Verwendung eines weiteren Methylierungsinhibitors (Neplanocin) ohne bislang bekannten hemmenden Einfluss auf den NF- κ B Signalweg wurden in verschiedenen Dosierungen Messungen an zellfrei perfundierten Rattenherzen vorgenommen, immunhistochemische Färbungen ausgewertet und Blutbildanalysen erstellt.

Die Perfusionsergebnisse belegen, dass die Applikation von LPS zu einer Erhöhung des koronaren Gefäßwiderstandes sowie zur Abnahme der Kontraktilität des Herzens führen. Während beide Veränderungen durch die Injektion von c3ado dosisabhängig vermindert - in der höchsten Dosierung sogar verhindert werden konnten - blieb Neplanocin ohne kardioprotektive Wirkung. Bei der immunhistochemischen Auswertung zeigte sich, dass LPS nachweislich über die zunehmende Markierung von Adhäsionsmolekülen eine Aktivierung von Endothelzellen bewirkt, die Migration von aktivierten Leukozyten beeinflusst und damit neben morphologischen Gewebeeränderungen zu Mikrozirkulationsstörungen des Herzens im fulminanten Sepsisgeschehen beiträgt. Mit steigender c3ado-Dosierung nahm das Ausmaß der

immunhistochemisch verifizierbaren pathologischen Veränderungen ab, während Neplanocin erneut keinen kardioprotektiven Effekt entfaltete. Auch bei der Blutbildanalyse blieb Neplanocin ohne kardioprotektive Wirkung. c3ado hingegen vermag der LPS-induzierten Thrombozytopenie und neutrophilen Granulozytose mit Linksverschiebung entgegenzuwirken.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass c3ado dosisabhängig kardioprotektiven Einfluss auf die Manifestation der LPS induzierten Kardiomyopathie nimmt. Dabei entfaltet c3ado in der höchsten Dosierung den größten Therapieeffekt, während Neplanocin sich ohne protektive Wirkung erwies. Die Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass sich das kardioprotektive Potential von c3ado nicht auf eine methylierungs-abhängige Eigenschaft, sondern womöglich auf eine Interaktion mit dem NF-kB Signalweg zurückführen lässt.

7 Summary

Alongside numerous other organ dysfunctions sepsis is accompanied by massive cardiac impairment – a clinical picture that has been described in recent years by the medical term “septic cardiomyopathy”. Pathophysiological septic cardiomyopathy can be characterized – despite increased cardiac output – by a progressive ventricular dilatation and myocardial hypokinesis, both leading to decreased ventricular ejection fraction and increased ventricular compliance. Ultimately, this leads to the heart’s incapacity to compensate the fall in systemic blood pressure seen in sepsis. Although remarkable improvement in intensive care medicine has been achieved, the rate of lethality caused by severe sepsis and septic shock still remains very high at over 50%. With regard to its pathogenesis, the invasion of bacteria and consequently their pathogenic factors, e.g. endotoxin (LPS) of gramnegative bacteria, seem to be of significant implication by eliciting the activation of different closely interlinked signal pathways, which may then induce the inflammatory reaction. In particular, the activation of leucocytes, endothelial cells, and transcription factor NF-kB amongst others and the release of cytokines play an important role.

In recent studies carried out in our laboratory we could demonstrate that 3-deazaadenosin (c3ado), a potent methylation inhibitor and inhibitor of the NF-kB signal pathway, was able to trigger a cardio-protective effect. In this context the objective of this study was to gain new findings about the dose-effect relationship of c3ado and a possible explanation for its mode of action. Using a further methylation inhibitor, neplanocin, without known influence on NF-kB signal pathway and used in variable doses, measurements were made on isolated cell-free perfused rat hearts. In addition immunohistochemical staining and blood analyses were performed.

The results of the perfusion demonstrated that the application of LPS caused an increase in coronary vascular resistance and a decrease in the contractility of the heart. Both effects could be reduced in relation to the c3ado dose given prior to perfusion and even prevented when the maximum dose was injected. In contrast, neplanocin did not show any cardio-protective effect.

Immunohistochemical examination of the heart revealed an activation of endothelial cells shown by a significant increase of marked adhesion molecules after LPS treatment. Furthermore, it could be demonstrated that LPS treatment caused morphological tissue- and microcirculatory changes in the cardiovascular system by influencing the migration of activated leucocytes. By increasing the dose of c3ado these histological verified alterations could be minimised, in contrary to Neplanocin, which again did not display any cardio-protective effect. Similarly, while blood analysis failed to show any

positive effect caused by neplanocin –c3ado alleviated LPS-induced thrombocytopenia and neutrophilia with associated left shift.

While reflecting the examinations of this study it becomes evident that c3ado, depending on the given dose, prevents (maximum dose) or reduces LPS-induced myocardial depression. Treatment with neplaoncin remains ineffective. The results give rise to the supposition that the cardio-protective potential of c3ado may not be the result of a methylation reaction, but can be affiliated to an interaction with the NF-kB signal pathway.

8 Abkürzungsverzeichnis

AdoHcy	Adenosylhomocystein
AdoMet	Adenosylmethionin
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-alkalische Phosphatase
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
c3Ado	3-Deazaadenosin
c3AdoHcy	3-Deazaadenosylhomocystein
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCP	Coronary perfusion pressure
CD11b	Cluster of Differentiation 11b
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DNA	Desoxyribonucleid Acid
dP/dt_{\max}	maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
EDHF	endothelium derived hyperpolarizing factor
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS	Fluorescence Aktivated Cell Scanner
Fab	antigenbindende Fragmente
Hcy	Homocystein
IL-1 β	Interleukin-1 beta
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LBP	LPS-binding-protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin)
LVEF	links ventrikuläre Ejektionsfraktion
LVDP	left ventricular developed pressure
MDS	Myocardial Depressant Substance
Met	Methionin
MODS	Multiorgan-Dysfunktions-Syndrom
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NEPL	Neplanocin
NF-kB	Nuclear Factor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
nNOS	neuronale NO-Synthase
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor

PAMP	pathogen associated molecular pattern
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
ROS	Reactive Oxygen Species, Sauerstoffradikale
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TLR	Toll like receptors
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule

9 Literatur

1. Surviving Sepsis Campaign. International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med 2008;36:296-327
2. Balk B.A. The septic syndrome. Definition and clinical implications. Crit Care Clinics 1998;5:1-8
3. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. Intensive Care Med 2004;30:535-555
4. Bodmann KF et al. Antimikrobielle Therapie der Sepsis. Chemotherapie Journal 10. Jahrgang, Heft 2/2001;43-55
5. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Chest. 1992;101:1644-1655
6. Müller-Werdan U. Akute septische Kardiomyopathie. Internist 1998. 38;467-478
7. Dhainaut J.F. Myocardial Dysfunction in Sepsis. Sepsis 2000;4:89-97
8. Granton JT, Goddard CM, Allard MF, Van Eeden S, Walley KR. Leukocytes and decreases left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:1977-1983
9. Snell RJ, Parrillo E. Cardiovascular Dysfunction in Septic Shock. Chest 1991;99:1000-1009
10. Grocott-Mason RM, Shah AM. Cardiac dysfunction in Sepsis: new theories and clinical implications. Intensive Care Med 1998;24:286-295
11. Flesch et al. Effects of endotoxin on human myocardial contractility. Involvement of nitric oxide and Peroxynitrite. Journal of the American College of Cardiology 1999;4:1062-70
12. Kumar A, Haery C, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock. Crit Care Clinics 2000;16:251-287
13. Brian S et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β synergistically depress human myocardial function. Crit Care Med 1999;7:1309-18
14. Tracey KJ et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. Science 1986;234:470-74
15. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF. Interleukin 1 und Tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte adrenergic responsiveness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989;86:6753-57
16. Finkel TH, Pabst MJ, Suzuki H, Guthrie LA, Forehand JR, Philipps WA, Johnston RB. Priming of neutrophils and macrophage for the enhanced release of

- superoxide anion by the calcium ionophore ionomycin: implications for regulation of the respiratory burst. *J. Biol. Chem.* 1987;262:12589-96
17. Murray DR, Freeman GL. Tumor necrosis factor- α induces a biphasic effect on myocardial contractility in conscious dog. *Circ Res* 1995;78:154-160
 18. Last-Barney K, Homan CA, Faanes RB et al. Synergistic and overlapping activities of tumor necrosis factor- α and IL-1
 19. Dinarello CA, Gelfand JA, Wolff SM. Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA* 1993;269:1829-35
 20. Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T et al. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1988;81:1162-72
 21. Kumar A, Thota V, Dee L et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin 1- β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996;3:949-958
 22. Meng X, Lihua AO et al. TNF- α and myocardia depression in endotoxemic rats: temporal discordance of an obligatory relationship. *Am. J. Physiol.* 1998;44:R502-R508
 23. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am. J. Physiol.* 1998;43:R577-R595
 24. Oral H et al. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor α in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Biol. Chem.* 1997;272:4836-42
 25. Yokohama T, Vaca L, Rossen Rd et al. Cellular basis of the negative inotropic effects of tumor necrosis factor in the adult mammalian cardiac myocyte. *J. Clin. Invest.* 1993;92:2303-12
 26. Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM et al. The cardiovascular response of normal humans to the administration of Endotoxin. *N. Engl. J. Med* 1989;321:280-7
 27. Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM et al. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-175
 28. Parker JL, Adams HR. Contractile Dysfunction of atrial myocardium from Endotoxin shocked pigs. *Am J Physiol* 1981;240:H954-H962
 29. Parker JL, Adams HR. Development of myocardial dysfunction in endotoxin shock. *Am J Physiol* 1985;248:H818-H826
 30. Natanson C, Danner RL, Elin RJ et al. The role of endotoxemia in cardiovascular dysfunction and mortality: *E.coli* and *S.aureus* challenges in a canine model of human septic shock. *J Clin Invest* 1998;83:243-251

31. Hinshaw LB, Archer LT, Spitzer JJ et al. Effects of coronary hypotension and Endotoxin on myocardial performance. *Am J Physiol* 1974;227:1051-1057
32. Peyton MD, Hinshaw LB, Greenfield LJ et al. The effects of coronary vasodilatation on cardiac performance during endotoxin shock. *Surg Gynecol Obstet* 1976;143: 533-538
33. Schneider AJ, Teule GJJ, Groeneveld ABJ et al. Biventricular performance during volume loading in patients with early septic shock, with emphasis on the right ventricle: A combined hemodynamic and radionuclide study. *Am Heart J* 1988;116:103-112
34. Cunnion RE, Schaer GL, Parker MM et al. The coronary circulation in human septic shock. *Circulation* 1986;73:637-644
35. Dhainaut JF, Huyghebaert MF, Monsallier JF et al. Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose and ketones in patients with septic shock. *Circulation* 1987;75:533-541
36. Hotchkiss RS, Karl IE. Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. *JAMA* 1992;267:1503-10
37. Hotchkiss RS, Rust RS, Dence CS et al. Evaluation of the role of cellular hypoxia in sepsis by the hypoxic marker [¹⁸F] fluoromisonidazole. *Am J Physiol* 1991;261:R965-R972
38. Solomon MA, Correra R, Alexander HR et al. Myocardial energy metabolism and morphology in canine model of sepsis. *Am J Physiol* 1994;266:H757-H768
39. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovascular research* 1996;32:752-763
40. Ulevitch RJ. Recognition of bacterial endotoxins by receptor dependent mechanisms. *Adv Immunol* 1993;53:267-289
41. Bloos FM, Morisaki HM, Neal AM, Martin CM, Ellis CG, Sibbald WJ, Pitt ML. Sepsis depresses the metabolic oxygen reserve of the coronary circulation in mature sheep. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(5):1577-84
42. Hinshaw LB. Sepsis/septic Shock: Participation of the microcirculation –an abbreviated review. *Crit Care Med* 1996;24:1072-1078
43. Groeneveld ABJ, Nauta JJP, Thijs LG. Peripheral vascular resistance in septic shock: Its Relation to outcome. *Intensive Care Med* 1988;14:141-147
44. Morisaki H, Bloos F, Keys J, Martin C, Neal A, Sibbald WJ. Compared to crystalloid, colloid therapy slows the progression of extrapulmonary tissue injury in septic sheep. *J Appl Physiol* 1994;77:1507-18
45. Nevier R, Sibbald W. Microvascular Alterations in Sepsis. *Sepsis* 2000;4:81-88

46. Astiz ME, Tilly E, Rackow ED, Weil MH. Peripheral vascular tone in sepsis. *Chest* 1991;99:1072-1075
47. Hartl WH, Gunther B, Inthorn D. Reactive hyperemia in patients with septic conditions. *Surgery* 1988;103:440-444
48. Avontuur JAM, Bruining HA, Ince C. Inhibition of nitrite oxide synthesis causes myocardial ischemia in endotoxemic rats. *Circ Res* 1995;76:418-425
49. Hersch M, Gnides AA, Bersten AD, Troster M, Rutledge FS, Sibbald WJ. Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery* 1990;107:397-410
50. Balk RA, Casey LC. Sepsis and septic shock. *Critical Care Clinics*. April 2000
51. Albrecht DM, van Ackern K, Bender HJ, Hof H, Kox W, Victor N, Funk P et al. Efficacy and safety of the platelet-activating factor receptor antagonist BN 52021 (Ginkgolide B) in patients with severe sepsis.
52. Undurti ND. Critical advances in septicemia and septic shock. *Crit Care*. 2000; 4(5):290-296
53. Kilburn RG, Griffith OW. Overproduction of nitric oxide in cytokine-mediated and septic shock. *J.Natl.Cancer. Inst.* 1992;84(11):827-31
54. Bessin P, Bonnet J, Appfel D et al: Acute circulatory collapse caused by platelet-activating factor (PAF-acether) in dogs. *Eur J Pharmacol* 1983;86:403-413
55. Handley DA, Van Valen RG, Saunders RN: Vascular response of platelet-activating factor in the *Cebus apella* primate and inhibitory profile of antagonists SR 63-072 and 63-119. *Immunopharmacology* 1986;11:175-182
56. Sybertz EJ, Watkins RW, Baum T et al: Cardiac coronary and peripheral vascular effects of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine in anaesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;232:156-162
57. Stahl GL, Bittermann H, Terashita Z et al: Salutary consequences of blockade of platelet activating factor in hemorrhagic shock. *Eur J Pharmacol* 1988;249:233-240
58. Ayala A, Chaudry ICH. Platelet activating factor and its role in trauma, shock and sepsis. *New Horiz* 1996; 4 (2): 265-75
59. Fletscher JR, DiSimones BS, Earnest MA: Platelet-activating factor receptor antagonist improves survival and attenuates eicosanoid release in severe endotoxemia. *Ann Surg* 1990;211:312-316
60. Rabinovici R, Yue TL, Farhat M et al: Platelet-activating factor (PAF) and tumour necrosis factor (TNF) interactions in endotoxemic shock. Studies with BN 50739, a novel PAF antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:256-263

61. Klabunde RE, Anderson DE. Role of nitric oxide and reactive oxygen species in PAF-induced microvascular leakage. *J Vasc Res* 2002; 39:238-245
62. Leonard EJ, Skeel A, Chiang PK, Cantoni GL. The action of the adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine, on phagocytic function of mouse macrophages and human monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978;84:102-109
63. Chiang CH, Wu CP, Perng WC, Yan HC, Yu CP. Use of anti-(tumour necrosis factor- α) antibody or 3-deaza-adenosine as additives to promote protection by University of Wisconsin solution in ischaemia/reperfusion injury. *Clinical Science* 2000;99:215-222
64. Zimmermann TP, Wolberg G, Duncan GS. Inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity by 3-deazaadenosine: evidence for a methylation reaction essential to cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978;75:6220-6224
65. Medzithradsky JL. Regulatory role for the immune complex in modulation of phagocytosis by 3-deazaadenosine. *J. Immunol.* 1984;133:946-949
66. Stopford CR, Wolberg G, Prus KL, Reynolds-Vaughn R, Zimmermann TP. 3-deazaadenosine induced disorganization of macrophage microfilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1985;83:4060-4064
67. Sung SJ, Silverstein SC. Inhibition of macrophage phagocytosis by methylation inhibitor: lack of correlation of protein carboxymethylation and phospholipid methylation with phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 1985;260:546-554
68. Yagawa K, Nakanishi M, Hayashi S et al. Abolishment of inhibitory effects of 3-deazaadenosine on superoxide generation of guinea pig phagocytes by preexposure to phorbol myristate acetate. *FEBS Lett.* 1986;201:287-290
69. Parnham MJ, Bittner C. Pharmacological analysis of guinea-pig macrophage chemiluminescence responses to platelet activating factor and opsonized zymosan. *Int. J. Immunopharmacol.* 1986 ;8 :951-959
70. Zimmermann TP, Wolberg G, Stopford CR, Prus KL, Iannone MA. Studies concerning the mechanism of action of 3-deazaadenosine in leukocytes. In *Biological Methylation and Drug Design* (Borchardt RT, Croveling CR, Ueland PM) p. 417, Humana Press, Clifton, NJ
71. Jurgensen CH, Huber BE, Zimmermann TP, Wolberg G. 3-Deazaadenosine inhibits leukocyte adhesion and ICAM-1 biosynthesis in tumor necrosis factor-stimulated human endothelial cells. *J. Immunol.* 1990;144:653-661
72. Hoque AM, Papapetropoulos A, Venema RC, Catravas JD, Fuchs LC. Effects of antisense oligonucleotide to iNOS on hemodynamic and vascular changes induced by LPS. *American Physiological Society* 1998

73. Marczin N, Papapetropoulos A, Catravas JD. Tyrosine kinase inhibitors suppress endotoxin-and IL-1-induced NO synthesis in aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1993;265:H1014-H1018
74. Yang BC, Chen LY, Saldeen TG, Mehta JL. Reperfusion injury in the endotoxin-treated rat heart: reevaluation of the role of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1997;120:305-311
75. Kilbourn RG, Jubran S, Gross S, Griffith OW, Levi R, Adams J, Lodato RF. Reversal of endotoxin-mediated shock by N-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992;172:1132-1138
76. Ungureanu-Langrois D, Balligand JL, Kelly RA, Smith TW. Myocardial contractile dysfunction in the systemic inflammatory response syndrome: Role of a cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:155-167
77. Kelly Ra, Balligand JL, Smith TW, Nitric oxide and cardiac function. *Circ. Res.* 1996;79:363-380
78. Meng X, Ao L, Brown JM, Fullerton DA, Banerjee A, Harken AH. Nitric oxide synthase is not involved in cardiac contractile dysfunction in a rat model of endotoxemia without shock. *Shock.* 1997;7:111-118
79. Schultz R, Panas DL, Catena R, Moncada S, Olley PM, Lopaschuk GD. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α . *Br J Pharmacol.* 1995;114:27-34
80. Klabunde RE, Codton AF. Nitric oxide synthase does not prevent cardiac depression in endotoxin shock. *Shock* 1995;3:73-78
81. Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and Cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Moll Cardiol* 1996;28:1631-1639
82. Goddard CM, Poon BY, Klut ME, Wiggs BR, vanEeden SF, Hogg JC, Walley KR. Leukocyte activation does not mediate myocardial leukocyte retention during endotoxemia in rabbits. *Am J Physiol.* 1998;275:H1548-H1557
83. Hinslaw LB, Archer LT, Beller-Todd BK. Hematologic disturbances during sepsis: platelets and leukocytes. *Adv Shock Res.* 1982;7:1-6
84. Hung J, Lew WYW. Cellular mechanism of endotoxin induced myocardial depression in rabbits. *Circ Res.* 1993;73:125-134
85. Finn A, Strobel S, Levin M, Klein N. Endotoxin-induced neutrophil adherence to endothelium: relationship to CD11b/CD18 and L-selectin expression and matrix disruption. *Ann NY Acad Sci.* 1994;725:173-182

86. Nathan C, Srimal S, Farber C, Sanchez E, Kabbash L, Asch A, Gailit J, Wright SD. Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins. *J Cell Biol.* 1989;109:1341-1349
87. Steinhoff G, Behrend M, Schrader B, Duijvestijn AM, Wonigeit K. Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. *Am J Pathol.* 1993;142:481-488
88. Garlanda C, Mantovani A. Cytokines and Adhesion in Mesothelial Cell Pathophysiology. *Sepsis.* 1999;3:271-283
89. Witthaut R, Farhood A, Smith CW, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor-alpha contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) up regulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia in vivo. *J Leukoc Biol.* 1994;55:105-111
90. Jilma B, Blann A, Pernerstorfer T, Stohlawetz P, Eichler HG, Vondrovec B, Amiral J, Richter V, Wagner OF. Regulation of Adhesion Molecules during Human Endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;159:857-863
91. Hack, C. E. and S. Zeerleder. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med.* 2001;29:21-27
92. Cordell JI et al. *J Histochem Cytochem* 1984;32:219-229
93. Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH, Key M, Welcher R, Harvey R, Atwood KN. Handbook of immunochemical methods. DAKO corporation 2001, 3. Auflage
94. Dhainaut J.F. Therapeutic perspectives in sepsis. In : Eichacker P.Q., Pugin J., Eds. *Evolving Concepts in Sepsis and septic Shock.* Kluwer Academic 2001
95. Walley KR. Mechanisms of decreased cardiac dysfunction in sepsis. In: Vincent J.L., Ed. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 1997. Berlin: Springer Verlag, 1997:243-255
96. Price S., Anning P.B., Mitchell J.A., Evans T.W. Myocardial dysfunction in Sepsis: Mechanisms and therapeutic implications. *Eur Heart J* 1999;20:715-724
97. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med.* 1991;115:457-469
98. Riches, D.W., Watkins, J.L., Henson, P.M. and Stanworth, D.R. (1985) Regulation of macrophage lysosomal secretion by adenosine, adenosin phosphate esters and related structural analogues of adenosine. *J. Leukocyte Biol.* 37, 545-557
99. Kayal, S., J.P.Jais, J.Frijns, J.Korteweg, H.Rommès, J.H.Peters, J.J.Sixma, and H.K.Nieuwenhuis. 1997. The origin of P-Selectin as a circulating plasma protein. *Thromb.Haemost.* 77:1081-1085
100. Cowley, H.C., D.Heney, A.J.Gearing, I.Hemingway, and N.R.Webster. 1994. Increased circulating adhesion molecule concentration in patients with the

- systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit. Care Med.* 2002;22:651-657
101. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin. Immunol* 2002;14:103-110
 102. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2001;2: 675-680,
 103. Edfeldt, K., J. Swedenborg, G. K. Hansson, and Z. Q. Yan. Expression of tolllike receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002;105:1158-1161
 104. Henneke, P. and D. T. Golenbock. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med.* 2002;30:207-213.
 105. Zimmerman, G. A., M. R. Elstad, D. E. Lorant, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, M. K. Topham, A. S. Weyrich, and R. E. Whatley. Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1996;416:297-304.
 106. Rot, A. Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today* 1992;13:291-294.
 107. Laudes I. J., Guo R.-F., Riedemann N. C., Speyer C., Craig R.J., Sarma V., Ward P. Disturbed homeostasis of lung intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 during Sepsis. *American Journal of Pathology.* 2004;164:1435-1445
 108. Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84:2068-2101
 109. Kayal S, Jais JP, Aguin N, Chaudiere J, Labrousse J: Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:776-784
 110. Boldt J, Muller M, Kuhn D, Linke LC, Hempelmann G: Circulating adhesion molecules in the critically ill: a comparison between trauma and sepsis patients. *Intensive Care Med* 1996;22:122-128
 111. Whalen MJ, Doughty LA, Carlos TM, Wisniewski SR, Kochanek PM, Carcillo JA: Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in the plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure. *Crit Care Med* 2000;28:2600-2607
 112. Gearing AJ, Newman W: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993;14:506-512
 113. Lawrence, M. B. and T. A. Springer. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through

- integrins. *Cell* 1991;65: 859-873
114. Issekutz TB, Miyasaka M, Issekutz AC: Rat blood neutrophils express very late antigen 4 and it mediates migration to arthritic joint and dermal inflammation. *J Exp Med* 1996;183:2175-2184
 115. Argenbright L.W., L.G. Letts, R. Rothlein: Monoclonal antibodies to the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesion in rabbits. *J. Leukocyte Biol.* 1991;49:253-457
 116. Albelda S.M., C.A. Buck: Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J.* 1990;4:2868-2880
 117. Ma X-I, Tsao PS, A.M. Lefer: Antibody to CD-18 exerts endothelial and cardiac protective effects in myocardial ischemia and reperfusion. *J. Clin. Invest.* 1991;88:1237-1243
 118. Ibbotson GC, Doig C, Kaur J, Gill V, Ostrovsky L, Fairhead T, Kubes P: Functional alpha4-integrin: a newly identified pathway of neutrophil recruitment in critically ill septic patients. *Nat Med* 2001;7:465-470
 119. Levi M.H. ten Cate, and P. T. van der. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med.* 2002;30:220-224.
 120. van Hinsbergh, W. M. Endothelial permeability for macromolecules. Mechanistic aspects of pathophysiological modulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997;17:1018-1023.
 121. Alexander J. S. and J. W. Elrod. Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat.* 2002;200:561-574.
 122. Dvorak A. M. and D. Feng. The vesiculo-vacuolar organelle (VVO). A new endothelial cell permeability organelle. *J Histochem. Cytochem.* 2001;49:419-432.
 123. Victor V.M., Rocha M., De la Funte M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International Immunopharmacology.* 2004 ;4 :327-347
 124. Jack RS, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, et al. Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine Gram-negative bacterial infection. *Nature* 1997;389:742-745
 125. Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF-kB and human disease. *J Clin Invest* 2001;107:3-6
 126. Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M. Positive and negative regulation of I κ B kinase activity through IKK-beta subunit phosphorylation. *Science* 1999;284:309-313

127. Mann JD, Mudd SH. Alkaloids and plant metabolism IV: the tyramine methyltransferase of barley roots. *J. Biol. Chem.* 1963;238:381-385
128. Chiang PK, Richards HH, Cantoni GL. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase: analogues of S-adenyl-L-homocysteine as potential inhibitors. *Molec. Pharmacol.* 1977;13:939-947
129. Zimmerman TP, Schmitges GJ, Wolberg G, Deeprose RD, Duncan GS, Cuatrecasas P, Elion GB. Modulation of cyclic AMP metabolism by s-adenosylhomocysteine and s-3-deazaadenosylhomocysteine in mouse lymphocytes. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1980;77:5639-5643
130. Borchardt RT. Inhibition of indolethylamine-N-methyltransferase by analogs. *Biochem Pharmacol.* 1975;24:1542-1544
131. Garcia-Castro I, Mato JM, Vasanthakumar G, Wiesmann WP, Schiffmann E, Chiang PK. *J Biol Chem.* 1983;258:4345-4349
132. Aksent'ev RR, Falk W, Cantoni GL. *J Biol Chem* 1982;257:621-625
133. Chiang PK, Mirra GA. *Biolog Methyl and drug design.* Humana press 1986;239-251
134. Zimmerman TP, Wolberg G, Stopford CR, Prus JL, Iannone MA. *Biolog Methyl and drug design.* Humana press. 1986;417-426
135. Shankar R, de la Motte CA, DiCorleto PE. 3-deazaadenosine inhibits thrombin-stimulated platelet-derived growth factor production and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1-mediated monocytic cell adhesion in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1992;267:9376-9382
136. Walker G, Langheinrich AC, Dennhauser E, Bohle RM, Dreyer T, Kreuzer J, Tillmanns H, Braun-Dullaeus RC, Haberbosch W. 3-deazaadenosine prevents adhesion molecule expression and atherosclerotic lesion formation in the aortas of C57BL/6J mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(11):2673-2679.
137. Jeong SY, Ahn SG, Lee JH, Kim HS, Kim JW, Rhim H, Jeong SW, Kim IK. 3-deazaadenosine, a S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, has dual effects on NF-kappaB regulation. Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity and promotion of IkappaBalpha degradation. *J Biol Chem* 1999;274(27):18981-18988
138. Jeong SY, Lee JH, Kim HS, Hong SH, Cheong CH, Kim IK. 3-Deazaadenosine analogues inhibit the production of tumour necrosis factor-alpha in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Immunology* 1996;89(4):558-62
139. Schmidt JA, Bomford R, Gao XM, Rhodes J. 3-Deazaadenosine--an inhibitor of interleukin 1 production by human peripheral blood monocytes. *Int J Immunopharmacol* 1990;12(1):89-97.

140. Montgomery JA, Clayton SJ, Thomas HJ, Shannon WM, Arnett G, Bodner AJ, Kion IK, Cantoni GL, Chiang PK. Carbocyclic analogue of 3-deazaadenosine: a novel antiviral agent using S-adenosylhomocysteine hydrolase as a pharmacological target. *J Med Chem* 1982;6:626-9
141. Mayers DL, Mikovits JA, Joshi B, Hewlett IK, Estrada JS, Wolfe AD, Garcia GE, Doctor BP, Burke DS, Gordon RK, et al. Anti-human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) activities of 3-deazaadenosine analogs: increased potency against 3'-azido-3'-deoxythymidine-resistant HIV-1 strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;1:215-219
142. Huggins J, Zhang ZX, Bray M. Antiviral drug therapy of filovirus infections: Sadenosylhomocysteinehydrolase inhibitors inhibit Ebola virus in vitro and in a lethal mouse model. *J Infect Dis* 1999;179:240-247
143. Langheinrich AC, Braun-Dullaes RC, Walker G, Jeide I, Schilling R, Tammoscheit K, Dreyer T, Fink L, Bohle RM, Haberbosch W. Effects of 3-deazaadenosine onhomocysteine and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2003;171:181-192
144. Bricaud, H.; Herdewijn, P.; DeClerq, E. *Biochem. Pharmacol.* 1983, 3583
145. Yaginuma S, Muto N, Tsujino M, Sudate Y, Hayashi M, Otani M. *J Antibiot.* 1981;34:359-366
146. Borchardt RT, Keller BT, Patel-Thombre U. Neplanocin A: A potent inhibitor of s-adenosylhomocysteine hydrolase and of vaccinia virus multiplication in mouse L929 cells. *J Biol Chem* 1984;7:4353-4358
147. De Clercq E. Antiviral and antimetabolic activities of neplanocins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985;28:84-89
148. Kitaoka S, Konno T, De Clercq E. Comparative efficacy of broad-spectrum antiviral agents as inhibitors of rotavirus replication in vitro. *Antiviral Res* 1986;6:57-65
149. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986;46:705-716
150. Opal SM, Huber CE. Bench-to-bedside review: toll-like receptors and their role in septic shock. *Crit Care* 2002;6(2):125-136
151. Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ et al. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr* 1998;128:2334-2340
152. Sheehan M, Wong HR, Hake PW et al. Partenolide, an inhibitor of nuclear factor-kB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol* 2002;61:953-963

153. Braun-Dullaeus RC, Dietrich S, Schoaff MJ, Sedding DG, Leithaeuser B, Walker G, Seay U, Matthias RF, Kummer W, Tilmanns H, Haberbosch W. Protective effect of 3-Deazaadenosin in a rat model of Lipopolysaccharide-induced myocardial dysfunction. *Shock* 2003;19(3):245-251
154. Walmrath, D, Scharmann M, König R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol*. 1993;74:1972-1980
155. Revelly, J.P, Ayuse T, Brienza N, Fessler HE, Robotham JL. Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. *Crit Care Med* 1996;24:1345-1351
156. Grandel, Fink UL, Blum A, Heep M, Buerke M, Kraemer HJ, Mayer K, Bohle RW, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U. Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor- α synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. *Circulation*. 2000;102:2758-2764
157. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Schreiner GF, Lange LG. Interleukin-1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte β -adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6753-6757
158. Gulick T, Pieper SJ, Murphy MA, Lange LG, Schreiner GF. A new method for assessment of cultured cardiac myocyte contractility detects immune factor-mediated inhibition of β -adrenergic responses. *Circulation*. 1991;84:313-321
159. Levi M. Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2:2094–2095
160. Mavrommatis AC, Theodoridis T, Orfanidou A, Roussos C, Christopoulou-Kokkinou V, Zakynthinos S. Coagulation system and platelets are fully activated in uncomplicated sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:451–457.
161. Yaguchi A, Lobo FLM, Vincent J-L, Pradier O. Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2004;2:2096–2102
162. Zein JG, Lee GL, Tawk M, Dabaja M, Kinasevitz GT. Prognostic significance of elevated serum lactate dehydrogenase in patients with severe sepsis. *Chest J*. 2004;126(4):873
163. Henninger DD, Panes J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC, Granger DN. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *J Immunol* 1997;158(4):1825-1832
164. Tegeder I, Pfeilschifter J, Geisslinger G. Cyclooxygenase-independent actions of cyclooxygenase inhibitors *FASEB J*. 2001;15:2057–2072

165. Hetland O, Brovold AB, Holme R, Gaudernack G, Prydz H. Thromboplastin (tissue factor) in plasma membranes of human monocytes. *Biochem J.* 1985; 228(3):735–743
166. Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R, Dal Nogare A, Nasraway S, Berman S, Cooney R, Levy H, Baughman R, Rumbak M, Light RB, Poole L, Allred R, Constant J, Pennington J, Porter S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998; 351 (9107):929-933
167. Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, Margolis Kudsk K, Zimmerli W, Anderson P, Reynaert M, Lew D, Lesslauer W, Passe S, Cooper P, Burdeska A, Modi M, Leighton A, Salgo M, Van der Auwera P. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1342 patients. *Crit Care Med* 2001;29 (3):503-510
168. Coulombe RA, Jr., Huie JM, Sharma RP, Huggins JW. Pharmacokinetics of the antiviral agent carbocyclic 3-deazaadenosine. *Drug Metab Dispos* 21 (4): 555-9., 1993
169. Medzihradsky JL, Zimmerman TP, Wolberg G, Elion GB. Immunosuppressive effects of the s-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine. *Journal of Immunopharmacology* 1982;4(1&2):29-41
170. Smith DM, Johnson JA, Turner RA. Biochemical Perturbations of BW 91Y (3-Deazaadenosine) on Human Neutrophil Chemotactic Potential and Lipid Metabolism. *Int J Tiss Reac* 1991;13(1):1-18

10 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Bad Hersfeld, 27.07.2012

Ort, Datum

Axel Gassen

Unterschrift

11 Danksagung

„The most difficult thing I know is to sit in front of a blank sheet of paper and try to start to write a book, article, story or whatever.“ Zitat von Michael Nitschke

Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Insbesondere gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R.C. Braun-Dullaeus für das Konzept und die Überlassung des Themas sowie die unermüdliche wissenschaftliche Betreuung, mit deren Würzung aus einem „*blank sheet of paper*“ diese Arbeit möglich wurde.

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Tillmanns, dass diese Arbeit in der Abteilung Kardiologie/Angiologie der Medizinischen Klinik I angefertigt werden konnte.

Darüberhinaus gilt mein Dank den medizinisch-technischen Assistenten Frau Tiziana Wieth, Antje Weber und Herrn Harald Michnacz sowie besonders Frau Ulrike Seay für ihre zahlreichen Anregungen und Hilfsbereitschaft bei allen labortechnischen Fragen. Für die freundliche Zusammenarbeit und die gute Arbeitsatmosphäre bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe.

Ein herzliches Dankeschön auch an meinen Onkel, Rainer Maria Gassen, der in zahlreichen Abendstunden die Arbeit Korrektur las sowie an meinen Großvater, Dr. med. Karl Gassen, der mich zum Studium der Medizin inspirierte.

Meiner Frau Melanie danke ich von Herzen für die pausenlose Unterstützung in allen Lebenslagen und das stetige Verständnis für die zeitliche Inanspruchnahme.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, Axel sen. & Marion Gassen, die mir dieses Studium erst ermöglichten und mich besonders bei dieser Arbeit unentwegt mit viel Geduld, Interesse und Motivation unterstützten.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**